

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS-JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Mullabakter *Pseudomonas putida* katalaas KatA defektse tüve konstrueerimine ja
iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Triin Uussaar

Juhendaja PhD Heili Ilves

TARTU 2020

INFOLEHT

Mullabakter *Pseudomonas putida* katalaas KatA defektse tüve konstrueerimine ja iseloomustamine

Oksüdatiivne stress tekib aeroobsetes organismides juhul kui hingamisahelas kõrvalproduktidena tekkivate reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) tase on kõrgem kui elusraku võime neid kahjutuks muuta. ROS-id nagu superoksiidi anioon ($O_2^{\cdot-}$), vesinikperoksiid (H_2O_2) ja hüdroksüülradikaal ($\cdot OH$) mõjutavad valkude struktuuri ja aktiivsust. ROS-id stimuleerivad rakkudes signaalradasid ja aktiveerivad ensümaatilised kaitsesüsteemid. Superoksiidi aniooni eemaldavad superoksiidi dismutaasid (SOD), vesinikperoksiidi eemaldavad katalaasid ning nende ekspressiooni kontrollivad regulaatorid HexR, FinR ja OxyR. Bakteris *Pseudomonas putida* reguleerib OxyR kahe peamise katalaasi KatA ja KatB ekspressiooni, kuid *katA* geen on enim indutseeritud oksüdatiivse stressi korral. Käesolevas töös uurisin, millist mõju avaldab *katA* puudumine *P. putida* rakkude kasvule oksüdatiivse stressi tingimustes ja mõõtsin rakusiseste ROS-ide taset uudse metoodikaga.

Märksõnad: Oksüdatiivne stress, ROS, OxyR, *katA*, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Construction and characterization of the soil bacterium *Pseudomonas putida* catalase KatA defective strain

Oxidative stress occurs in aerobic organisms when the level of reactive oxygen species (ROS) formed as by-products in the respiratory chain is higher than the ability of a living cell to render them harmless. ROS like superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and also hydroxyl radical ($\cdot OH$) have an effect on the structure and activity of proteins. These ROS stimulate cell-signaling pathways and lead to defense systems which are provided by enzymes. The superoxide anion is eliminated by superoxide dismutases (SOD), hydrogen peroxide is removed by catalases and their expression is controlled by regulators, such as HexR, FinR and OxyR. OxyR regulates the expression of two major catalases KatA and KatB in *Pseudomonas putida* but only *katA* gene is highly induced under oxidative stress. In the current work I studied the impact of the lack of *katA* gene on the growth of *P. putida* cells under oxidative stress and measured the levels of intracellular ROS by using a novel methodology.

Keywords: Oxidative stress, ROS, OxyR, *katA*, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Oksüdatiivne stress ja reaktiivsed hapnikuühendid.....	6
1.2 Reaktiivsete hapnikuühendite teke.....	6
1.3 Kaitsemehhanismid oksüdatiivse stressi vastu	7
1.4 <i>Pseudomonas putida</i> kaitsemehhanismid oksüdatiivse stressi vastu.....	8
1.4.1 Transkriptsiooni regulaator SoxR.....	9
1.4.2 Transkriptsiooni regulaator HexR	9
1.4.3 Transkriptsiooni regulaator FinR.....	9
1.4.4 Transkriptsiooni regulaator OxyR	10
1.5 <i>Pseudomonas putida</i> katalaas KatA	12
1.6 ROS-ide detekteerimine fluorestseeruvate ühenditega	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1 Töö eesmärgid	15
2.2 Materjal ja meetodika	15
2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid	15
2.2.2 Praimerite disainimine.....	17
2.2.3 PCR.....	18
2.2.4 Ligaasi- ja restriksioonisegude ning PCR produktide sadestamine.....	18
2.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine ning elektroporatsioon	19
2.2.6 DNA eraldamine agarosgeelist ning rakkudest ja DNA restriksioonanalüüs	20
2.2.7 Gelelektroforees	20
2.2.8 Kloonimine	20
2.2.9 Sekveneerimine	21
2.2.10 <i>P. putida</i> katalaas katA deletsioontüve konstrueerimine	21
2.2.11 Endogeense ROS-i detekteerimine rakkudest	22
2.3 Tulemused ja arutelu	23
2.3.1 Oksüdatiivse stressi tundliku <i>P. putida</i> sensortüve konstrueerimine ja iseloomustamine	23
2.3.2 <i>P. putida</i> katA deletsioontüvede kasv ROS-i tekitavate kemikaalide juuresolekul.....	23
2.3.3 <i>P. putida</i> katA deletsioontüvede fluorestsents ja siderofooride tootmine	29
2.3.4 <i>P. putida</i> Δ katA sensortüve ROS-ide tase oksüdatiivse stressi korral.....	30
KOKKUVÕTE.....	33
SUMMARY	34
KIRJANDUSE LOETELU	35
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	41

KASUTATUD LÜHENDID

Amp- ampiltsilliin

Bp- bensüülpenitsilliin

CAA- kaseiini hüdroolüsaat (ingl k- *casamino acids*)

Cipro- ingl k- *ciprofloxacin*

glc- glükoos (ingl k- *glucose*)

Km- kanamütsiin

LB- lüsogeenne sööde (ingl k- *lysogeny broth*)

NQO- ingl k- *nitroquinoline*

PQ- parakvaat (ingl k- *paraquat*)

ROS- reaktiivsed hapnikuühendid (ingl k- *reactive oxygen species*)

WT- metsiktüvi (ingl k- *wild-type*)

SISSEJUHATUS

Aeroobsed bakterid kasutavad molekulaarset hapnikku hingamiseks või energia saamiseks läbi toitainete oksüdeerimise. Selline hapniku kasutamine tekitab paratamatult ka reaktiivseid hapnikuühendeid (ROS), mis võivad rakkudes kahjustada makromolekule, tekitada mutatsioone või viia isegi rakkude surmani. Tekkinud olukorda nimetatakse oksüdatiivseks stressiks ning enimtuntud ROS-id on superoksiidi anioon, vesinikperoksiid ja hüdroksüülradikaal. ROS-id võivad olla nii ekso- kui ka endogeenset päritolu, keskkonnast pärit või tekkinud rakkudes elutegevuse käigus (Fridovich, 1978; Betteridge, 2000; Cabiscoll jt, 2000; Imlay, 2008; Kim jt, 2019).

Bakterites on olemas kaitsemehhanismid nii ROS-ide äratundmiseks kui ka nende eemaldamiseks. ROS-e tunnevad rakkudes ära transkriptsiooni regulaatorid SoxR, HexR, FinR ja OxyR. ROS-e eemaldavad superoksiidi dismutaasid (SOD), mis eemaldavad superoksiidi aniooni ja vesinikperoksiidi eemaldajateks on katalaasid või alküülhüdroperoksiidi reduktaasid. Bakteril *Pseudomonas putida* on leitud neli katalaasi geeni PP_0015 ehk *katE*, PP_0481 ehk *katA*, PP_2887 ja PP_3668 ehk *katB* (Nelson jt, 2002). Oksüdatiivse stressi korral on neist enim aktiveeritud katalaas KatA ekspressioon (Yeom jt, 2012; Bojanovič jt, 2017).

Minu töö eesmärgiks oli konstrueerida *Pseudomonas putida* katalaasi *katA* deletsioontüvi ning iseloomustada, millist mõju avaldab *katA* puudumine *P. putida* rakkude kasvule oksüdatiivse stressi tingimustes.

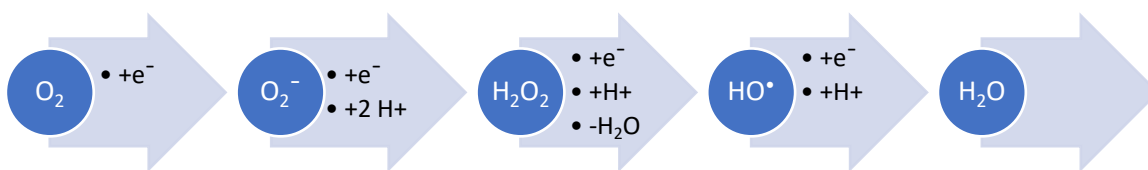
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Oksüdatiivne stress ja reaktiivsed hapnikuühendid

Reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) kuhjumine rakus põhjustab oksüdatiivset stressi (Kim jt, 2019). ROS-id tekivad hapniku redutseerimise käigus nii ekso- kui ka endogeensete protsesside toimetel ning enimtuntumad neist on näiteks superoksiidi anioon (O_2^-) vesinikperoksiid (H_2O_2) ja hüdroksüülradikaal ($\cdot OH$) (vt. joonis 1) (Fridovich, 1978; Betteridge, 2000; Imlay, 2008).

O_2^- ja H_2O_2 moodustuvad rakkudes juhuslikult, kui molekulaarne hapnik oksüdeerib redoksensüüme, mis osalevad elektronide transportimisel teistele substraatidele; hüdroksüülradikaal tekib aga siis, kui rauaioon kannab üle elektroni vesinikperoksiidile (Imlay, 2003).

Superoksiidi anioon ja vesinikperoksiid seonduvad Fe-S klastrit sisaldavate ensüümide aktiivsaiti, seondudes raua aatomiga ning oksüdeerivad klastrit nii, et ensüüm muutub ebastabiilseks (Imlay, 2008). H_2O_2 oksüdeerib valkudes tsüsteiini jääke, tekitades sulfeenhappe adduktid, mis tekitavad kas ristsidemeid teiste tsüsteiinidega, või neid oksüdeeritakse edasi (Imlay, 2003). Sellised muutused häirivad aga raku normaalset elutegevust ning võivad osutuda letaalseks. Seetõttu vajavad rakud kaitsemehhanisme ning -sensoreid, et ära tunda ja eemaldada tekkinud reaktiivseid hapnikuühendid.



Joonis 1: Hapniku redutseerumine, ROS-ide teke. (Fridovich, 1978, muudetud)

1.2 Reaktiivsete hapnikuühendite teke

ROS-id võivad olla nii ekso- kui ka endogeenset päritolu, keskkonnast pärit või tekkinud rakkudes elutegevuse käigus. Endogeenset oksüdatiivset stressi põhjustab aeroobne metabolism ning rakuväliselt indutseerivad ROS-ide teket näiteks antibiootikumid, desinfektsioonivahendid, detergendid, raskmetallid, orgaanilised lahustid (Dos Santos jt,

2004; Imlay, 2008; Kim ja Park, 2014). Näiteks parakvaat, mida kasutatakse ka herbitsiidina, redutseerub stabiilseks ühendiks, mis suudab reageerida hapnikuga ning tekitab superoksiidi aniooni (Fridovich, 1978). Messner ja Imlay (1999; 2002) näitasid, et O_2^- ja H_2O_2 tekivad endogeenselt rakkudes tänu hingamisahela komponentide, näiteks NADH dehüdrogenaas II ja fumaraadi reduktaasi autoooksüdeerumise käigus *E. coli*-s (Messner ja Imlay, 1999; 2002). NADH dehüdrogenaas II katalüüsib hingamisahelas elektronide ülekande NADH-lt üle flaviin-kofaktori ubikinoonile (Messner ja Imlay, 1999). NADH dehüdrogenaas II suudab hingamisahelas kanda elektrone edasi ühe- või kahekaupa, mida tõendab see, et kahe molekuli O_2^- kohta genereeriti dismutatsiooni teel üks molekul H_2O_2 (Messner ja Imlay, 1999). Messner ja Imlay (1999) näitasid, et NADH dehüdrogenaas II genereeris O_2^- ja H_2O_2 läbi redutseeritud kofaktori FAD autoooksüdatsiooni (Messner ja Imlay, 1999).

Dwyer jt. (2009) näitasid, et DNA güras inhibeeriv antibiootikum norfloxacin aktiveerib *E. coli*-s regulaatori SoxR, mis aktiveerub O_2^- stressi korral (Dwyer jt, 2009). Lisaks sellele toovad Kim ja Park (2014) välja oma töös teisigi oksüdatiivset stressi põhjustavad faktoreid bakteris *Pseudomonas putida*, kuhu kuuluvad näiteks bakterite poolt lagundatavad ühendid fenool ja naftaleen, aga ka interaktsioon taimedega ning kokkupuude keskkonnas leiduvate erinevate metallidega, näiteks mangaan, nikkel, koobalt (Kim ja Park, 2014).

Kuna bakter *P. putida* suudab tänu oma metaboolsele mitmekülsusele elada väga erinevates keskkondades nagu näiteks mullas, vees, taime juurtel, raskemetallidega saastunud keskkonnas, (Dos Santos jt, 2004) siis paratamatult tekivad rakkudes ka ROS-id, mida on vaja eemaldada, et kaitsta rakke oksüdatiivse stressi eest, mis võib tekitada mutatsioone või olla letaalne.

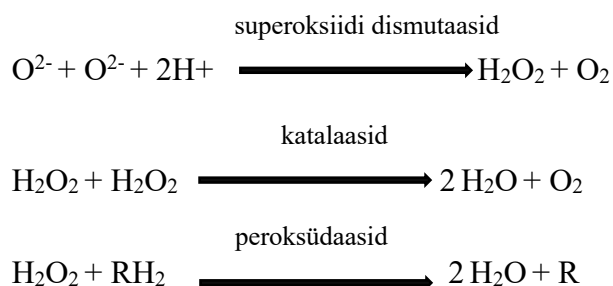
1.3 Kaitsemehhanismid oksüdatiivse stressi vastu

ROS-id põhjustavad rakkudes makromolekulide (DNA, RNA, valgud, lipiidid) kahjustusi ning seetõttu tekivad membraani kahjustused, valkude funktsiooni kadumine, DNA replikatsiooni blokeerimine ning see võib põhjustada uute mutatsioonide teket või raku surma (Cabiscol jt, 2000). Seega peavad bakterites olema mehhanismid nii ROS-ide äratundmiseks kui ka nende eemaldamiseks. Johnson ja Hug (2019), kasutades “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*” klassifikatsiooni süsteemi, toovad välja oma töös 26 teadaolevat ensüümi, mis eemaldavad rakkudes ROS-e ning leidsid, et proteobakteritel, kuhu kuulub ka

Pseudomonas putida, kodeeris suurim osa genoomist ROS-e eemaldavaid ensüüme (Johnson ja Hug, 2019).

Ensüüm, mis eemaldab superoksiid aniooni, superoksiidi dismutaas (SOD), katalüüsib superoksiidi konversiooni vesinikperoksiidiks ja hapnikuks (Fridovich, 1975).

Vesinikperoksiidi eemaldab katalaas, kandes kaks elektroni ühelt vesinikperoksiidilt teisele, mis omakorda lagunevad veeks ja hapnikuks (vt. joonis 2) (Kim jt, 2019). Samuti eemaldab vesinikperoksiidi ka peroksüdaas, mis kuulub katalaaside perekonda (Chelikani jt, 2004).



Joonis 2: Ensümaatiline kaitse ROS-ide vastu. (Fridovich, 1978, muudetud)

1.4 *Pseudomonas putida* kaitsemehhanismid oksüdatiivse stressi vastu

Pseudomonas putida on kosmopoliitne bakter, keda on leitud nii mullast kui ka veest. Tänu oma metaboolsele mitmekülgsele ning madalale toitainete vajadusele suudab *P. putida* kasutada kasvuks erinevaid substraate (Dos Santos jt, 2004). *P. putida* tüvel KT2440 on leitud kaks SOD geeni, *sodA*, mis kodeerib mangaanist sõltuvat ja *sodB*, mis kodeerib rauast sõltuvat SOD-i ning neid geene ekspresseeritakse erinevalt sõltuvalt bakterite kasvufaasist, raua ja mangaani olemasolust (Kim ja Park, 2014). Bojanovič ja kolleegid (2017) toovad välja oma uurimuses, et *sodA* ja *sodB* ekspressioonis ei ilmnenu mingeid muutuseid pärast rakkude töötlust 0,5 mM vesinikperoksiidiga; vesinikperoksiidi redutseerisid veeks ja hapnikuks katalaasid või alküülhüdروperoksiidi reduktaas (Bojanovič jt, 2017).

Bakteril *P. putida* on kirjeldatud neli katalaasi geeni: PP_0015 ehk *katE*, PP_0481 ehk *katA*, PP_2887 ja PP_3668 ehk *katB* (Nelson jt, 2002). *P. putida* geeni *katA* ekspresseeritakse logaritmilises kasvufaasis (Chelikani jt, 2004). Samuti eemaldab väikeses koguses rakkudest vesinikperoksiidi alküülhüdروperoksiidi reduktaas AhpC, mis vajab reaktivatsiooniks NADH-d, mida on vaja ka elektrontransportahelas (Hishinuma jt, 2006).

1.4.1 Transkriptsiooni regulaator SoxR

Superoksiidi poolt põhjustatud oksüdatiivse stressi äratundja on kahekomponente süsteem SoxRS, mille reguloni kuulub bakteris *E. coli* vähemalt 10 geeni (Cabiscol jt, 2000). Superoksiidi stressi korral indutseeritakse *P. putida*-s geenid *fpr* (ferredoksiin-NADP⁺ reduktaas), *fumC-1* (fumaraas C), *sodA* (mangaansõltuv superoksiidi dismutaas), *zwf-1* (glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas), mis *E. coli*-s kuuluvad SoxRS reguloni (Park jt, 2006). *P. putida*-l on olemas SoxR homoloog, mis on sensor ning millel on 62% aminohappeline sarnasus *E. coli* SoxR-iga, kuid tal puudub SoxS analoog (Kim ja Park, 2014). SoxR aktiveerub, kui oksüdeerub tema Fe-S klaster. Aktiveeritud SoxR indutseerib *soxS* geeni transkriptsiooni. SoxS on otseselt SoxRS reguloni individuaalsete geenide aktivaator bakteris *E. coli* (Park jt, 2006). Seega ei ole SoxR bakteris *P. putida*-s otseselt seotud oksüdatiivse stressi vastusega.

1.4.2 Transkriptsiooni regulaator HexR

Bakteris *P. putida* on oksüdatiivse stressi kaitsega seotud geen *zwf-1* (glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas), mida reguleerib negatiivselt valk HexR (Kim ja Park, 2014). HexR repressseerib *zwf-1* ekspressiooni, kuid kui glükoos transporditakse rakku ja metaboliseeritakse 2-keto-3-deoksü-6-fosfoglükonaadiks (KDPG), siis seondub HexR KDPG-ga, vabaneb DNA-lt, muutes võimalikuks geeni *zwf-1* transkriptsiooni (Campilongo jt, 2017). HexR vabanemine *zwf* promootoralalt suurendab NADPH produktsiooni *P. putida*-s oksüdatiivse stressi korral (Kim ja Park, 2014). NAD(P)H oksüdeeritakse NAD(P)⁺ ning seeläbi saavutatakse redokstasakaal, mis häirub oksüdatiivse stressi korral (Campilongo jt, 2017).

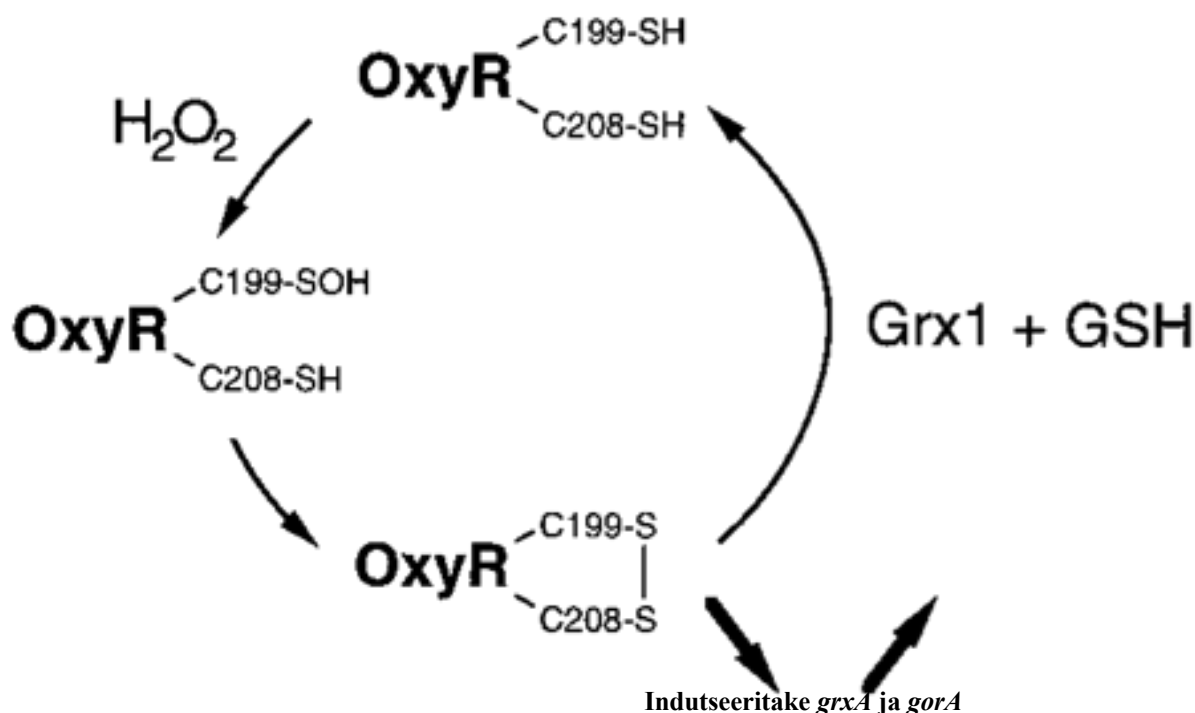
1.4.3 Transkriptsiooni regulaator FinR

FinR seondub otseselt geeni *fpr* promootoriga *P. putida* tüves KT2440 ning see on hädavajalik *fpr* geeni transkriptsiooni indutseerimiseks superoksiidi stressi korral (Kim ja Park, 2014). *fpr* kodeerib ferredoksiin-NADP⁺ reduktaasi, mis katalüüsib mõlemasuunalist elektronide ülekande reaktsiooni NADPH ja üheelektronilise kandja vahel nagu näiteks ferredoksiin või flavodoksiin (Xiao jt, 2018).

1.4.4 Transkriptsiooni regulaator OxyR

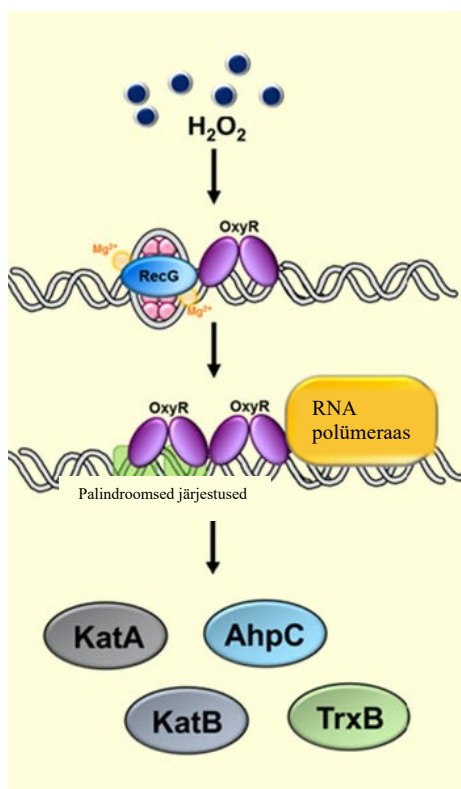
Morgan jt (1986) näitasid, et vesinikperoksiid indutseerib regulaatori OxyR ekspressiooni *E. coli*-s (Morgan jt, 1986). OxyR on nii peroksiidstressi äratundja kui ka signaali edasiandja (Wang jt, 2006). Bakteris *E. coli* kuuluvad OxyR reguloni geenid, mis on vajalikud H₂O₂ eemaldamiseks, näiteks *katE* ja *ahpCF* (Dubbs ja Mongkolsuk, 2012). *oxyR* geeni deleteerimisel ei olnud *E. coli* ja *Salmonella typhimurium*-i rakud suutelised indutseerima OxyR reguloni ning olid seetõttu hüpersensitiivsed vesinikperoksiidi suhtes (Christman jt, 1988).

Oksüdatiivse stressi ajal, mis on põhjustatud vesinikperoksiidist, oksüdeeritakse valk OxyR, mis omakorda aktiveerib OxyR reguloni geenide transkriptsiooni (Storz jt, 1990). *E. coli*-s seondub OxyR sihtmärk geeni 5' otsa konserveerunud motiiviga (Zheng jt, 1998). Hishinuma jt (2006) näitasid, et bakteris *P. putida* seondub OxyR otseselt *katA*, *katB* ja *ahpC* geeni promootoritega (Hishinuma jt, 2006). Ochsner ja kolleegid (2000) näitasid, et OxyR reguleerib *katA*, *katB*, *ahpB* ja *ahpCF* geene bakteris *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner jt, 2000). Kui rakkudes puuduvad ROS-id, siis regulaator OxyR on inaktiveeritud (Cabiscol jt, 2000). Zheng ja kolleegid (1998) näitasid, et *E. coli*-s OxyR aktiveeritakse, kui moodustub valgus disulfiidside, mille moodustumiseks on vajalik vesinikperoksiid (vt. joonis 3). OxyR inaktiveeritakse läbi ensümaatilise reaktsiooni, mille viib läbi glutaredoksiin 1 (Grx1) ning selle geeni (*grxA*) transkriptsiooni reguleerib OxyR (Zheng jt, 1998). Seega on OxyR regulon autoreguleeritav.



Joonis 3: OxyR aktiveerumise ja inaktiveerumise mudel. H_2O_2 olemasolul oksüdeerub OxyR Cys199 jääk ning tekib sulfeenhape. See reageerib OxyR Cys208-ga ja moodustub stabiilne disulfiidside, mis nõ lukustab OxyR aktiivsesse vormi. Oksüdeeritud OxyR redutseerub läbi disulfiidsilla redutseerumise, mille viib läbi glutaredoksiini süsteem, kuhu kuuluvad Grx1 (glutaredoksiin 1) ja GSH (redutseeritud glutatioon). Kuna OxyR reguleerib *grxA* (Grx1) ja *gorA* (glutatioon reduktaas) transkriptsiooni, siis on protsess autoreguleeritav. (Zheng jt, 1998, muudetud)

Disulfiidsideme moodustumine OxyR tsüsteiini jääkide vahel põhjustab struktuurseid muutuseid valgu regulaatordomeenis (aminohapped 80 kuni 305), mis omakorda põhjustab subühikute seondumist tetrameeriks, võimaldades OxyR-il seonduda DNA-ga ja RNA polümeraasiga (Dubbs ja Mongkolsuk, 2012). Oksüdeeritud OxyR seondub sihtmärkgeeni promootorpiirkonnaga ning aktiveerib sellelt transkriptsiooni, seondudes otseselt RNA polümeraasiga (vt. joonis 4) (Wang jt, 2006). Yeom ja kolleegid näitasid, et bakteris *P. putida* kuulub *recG* (DNA helikaas) samasse operoni, mis *oxyR*-gi ning RecG seondub otseselt palindroomsete järjestustega, mis on OxyR seondumissaidid sihtmärkgeenil ning see on vajalik oksüdatiivse stressi kaitsega seotud geenide aktivatsiooniks (Yeom jt, 2012). Lisaks näitasid nad, et RecG vajab Mg^{2+} ioone ja ATP-d funktsioneerimiseks (Yeom jt, 2012).



Joonis 4: RecG “keerab” DNA palindroomsetelt järjestustelt lahti, mis on vajalik transkriptsiooni alustamiseks. Vesinikperoksiid oksüdeerib OxyR, mis seondub seejärel sihtmärkgeeni promootorpiirkonnaga. OxyR moodustab valk-valk sideme RNA polümeraasiga ning algab geeni transkriptsioon. TrxB – tioredoksiini reduktaas. (Kim ja Park, 2014, muudetud)

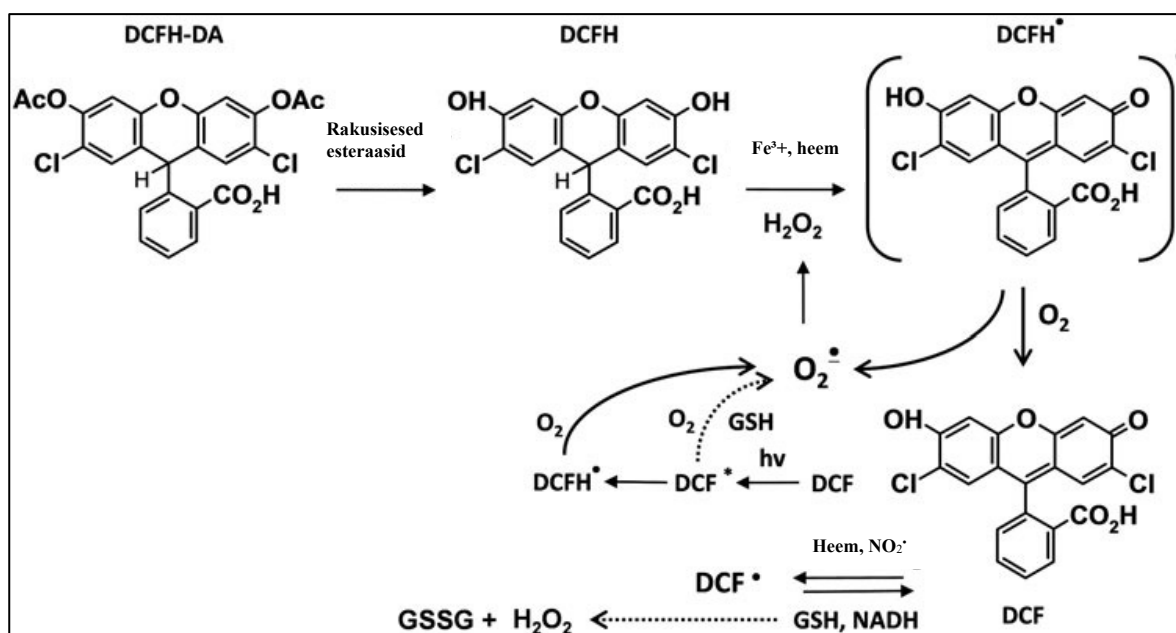
1.5 *Pseudomonas putida* katalaas KatA

Kasutades geelfiltratsiooni, näitasid Hishinuma jt (2006), et *P. putida* monomeerse katalaasi KatA molekulmass on 55 kDa ning natiivsel valgul 220 kDa (Hishinuma jt, 2006). Lisaks näitasid nad, et KatA on tetrameerne valk ning selle aktiivsus standardtingimustes on 30-korda suurem kui katalaasil KatB ning KatA-d reguleerib regulator OxyR (Hishinuma jt, 2006). KatA aktiivsus suureneb kokkupuutel eksogeense vesinikperoksiidiga (Anderson ja Miller, 2001). *P. putida* KatA on sarnane paljudele teistele monofunktsionaalsetele katalaasidele, nagu näiteks *E. coli* katalaas KatE (Kim ja Park, 2014).

1.6 ROS-ide detekteerimine fluorestseeruvate ühenditega

Rakusisese H_2O_2 detekteerimiseks saab kasutada 2,7-diklorodihüdrofluoresiin diatsetaati (DCFH-DA), ekstratsellulaarse vesinikperoksiidi tuvastamine toimub läbi Amplex Red-I ehk

DCFH-DA on rakumembraani läbiv ester, mis hüdrolyüsitakse rakkudes esteraaside poolt dihüdroksü-DCFH-ks, mis ei pääse rakkudest välja (Dikalov ja Harrison, 2014). DCFH on tundlik ROS-idele ning oksüdeeritakse tugevalt fluoreseeruvaks 2,7-diklorofluoressiiniks (DCF) (Rastogi jt, 2010). Samas toovad Dikalov ja Harrison (2014) välja, et DCFH-DA kasutamisel H_2O_2 detekteerimiseks on omad puudused, kuna DCFH ei reageeri otseselt H_2O_2 -ga ja paljud teised üheelektronilised ühendid võivad oksüdeerida DCFH DCF-iks (Dikalov ja Harrison, 2014). Kuna DCFH redutseeritakse fluoreseeruvaks värviks, siis võivad tekkida vaheühendid, mis reageerivad hapnikuga ning tekivad superoksiidi anioonid, mille eemaldamise käigus tekib samuti H_2O_2 , mis võib omakorda tekitada fluoressentssignaali intensiivistumise (vt. joonis 5) (Hardy jt, 2018).



13

Ekstratsellulaarse H_2O_2 detekteerimiseks kasutatakse määrdõika peroksüdaasi (HRP) katalüüsitud oksüdatsiooni, kus mitte-fluoresseeruv Amplex Red oksüdeeritakse vesinikperoksiidi poolt fluoreseeruvaks resorufiiniks (Dikalov ja Harrison, 2014). Tegemist on väga tundliku ja spetsiifilise testiga. Samas võib Amplex Red-I oksüdeerida peroksünitrit ning resorufiini hulka võib mõjutada HRP olemasolu (Hardy jt, 2018).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Enamusele elusorganismidest on hapnik eluliselt vajalik elektronide aktseptorina hingamisahela viimases etapis. Ent aeroobses metabolismis tekivad paratamatute kõrvalproduktidena ka osaliselt redutseeritud hapnikuühendid, mis on reaktiivsemad kui molekulaarne hapnik ja võivad kahjustada erinevaid komponente rakus (Cabisco jt, 2000; Kim jt, 2019). Katalaas on üks olulistest reaktiivseid hapnikuühendeid eemaldavatest ensüümidest (Kim jt, 2019). Bakteril *P. putida* on kirjeldatud neli katalaasi geeni: PP_0015 ehk *katE*, PP_0481 ehk *katA*, PP_2887 ja PP_3668 ehk *katB* (Nelson jt, 2002). On näidatud, et bakteri *P. putida* tüve KT2440 rakkudes on oksüdatiivse stressi korral kõige tugevamalt aktiveeritud *katA* geeni transkriptsioon (Yeom jt, 2012; Bojanovič jt, 2017).

Käesolev bakalaureusetöö kasvas välja uurimisgrupi vajadusest tuvastada oksüdatiivse stressivastuse teket bakteris *Pseudomonas putida*. Kuna meie laboris puudus oksüdatiivse stressi tundlik *P. putida* tüvi, mis võimaldaks hinnata oksüdatiivse stressivastuse olemasolu, siis sellest lähtuvalt püstitusid minu uurimistöö eesmärgid:

1. konstrueerida *Pseudomonas putida* katalaasi *katA* deletsioontüvi;
2. iseloomustada konstrueeritud bakteritüve kasvu oksüdatiivset stressi esilekutsuvate kemikaalide juuresolekul;
3. mõõta metsiktüvel ja katalaas *katA* deletsioontüvel rakusisest ROS-ide taset kasutades 2,7-diklorodihüdrofluoresiin diatsetaati.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Baktereid kasvasin LB (ingl k- *lysogeny broth*) täissöötmes (Miller, 1992) või M9-glükoos-CAA (ingl k- *casamino acids*) minimaalsöötmes. M9-glükoos-CAA (edaspidi glc CAA) valmistamiseks lisasin 1xM9 puhvrissi glükoosi (lõppkontsentratsioon 10 mM), aminohapete hüdrolüsaati (20% CAA + 1 mg/ml trüptofaani, lõppkontsentratsioon 0,2%), mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 µM MgO, 50 µM CaCO₃, 40 µM FeSO₄, 12,5 µM ZnSO₄, 12,5 µM MnSO₄, 2,5 µM CuSO₄, 2,5 µM, CoSO₄, 1,9 µM H₃BO₄). Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisin rakukultuure loksutil. Tardsöötme valmistamiseks lisasin söötmesse agarit 1,5 g/l.

Plasmiidide ja bakteritüvede selektsiooniks lisasin söötmale antibiootikume kanamütsiin (Km, lõppkontsentratsioon 50 µg/ml), ampitsilliini (Amp, lõppkontsentratsioon 100 µg/ml), bensüülpenitsiliini (Bp, lõppkontsentratsioon 1,5 mg/ml). Vajadusel lisasin söötmesse toluuaati lõppkontsentratsiooniga 3 mM, parakvaati (PQ) lõppkontsentratsiooniga 0,01 mM, 0,02 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, H₂O₂ lõppkontsentratsiooniga 100 µM, 200 µM, 260 µM, 1,5 mM, ciprofloxacini (cipro, lõppkontsentratsiooniga 0,03 µg/ml), nitroquinoline (NQO, lõppkontsentratsiooniga 240 µM ja 280 µM).

Kasutatud bakteritüved on esitatud tabelis 1, samuti on kasutatud plasmiidid ja vektorid esitatud tabelis 1. *E. coli* rakke on kasvatatud temperatuuril 37 °C ning *P. putida* rakke temperatuuril 30 °C.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Bakteritüvi	Iseloomustus	Päritolu
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	<i>P. putida</i> sekveneeritud tüvi	(Bagdasarian jt, 1981)
KT2440 $\Delta katA$	Deleteeritud katalaas <i>katA</i>	Käesolev töö
$\Delta P1$	<i>P. putida</i> genoomist väljunud profaag P1	Saadud Sirli Rosendahli käest
<i>Escherichia coli</i>		
CC118 λ pir	$\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 \lambda pir$ lysogen	(Herrero jt, 1990)
Plasmiid/vektor		
pRM6-GFP(Km ^R) ehk pSNW2(Km ^R)	I-SceI restriksioonisaite, multikloneerimisjärjestust ja GFP-d sisaldav suitsiidplasmiid, Km ^R	(Wirth jt, 2019)
pSW(I-SceI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmiid, Amp ^R	(Wong ja Mekalanos, 2000)
pSNW2/ $\Delta katA$	pSNW2 plasmiid, kuhu on kloonitud EcoRI ja BamHI fragmendina geeni <i>katA</i> eelse ja järgse ala liitfragment, Km ^R	Käesolev töö

2.2.2 Praimerite disainimine

Kuna töö eesmärk on konstrueerida *P. putida* katalaas KatA deletsioontüvi, oli esmalt vaja disainida praimerid, mille abil saaks amplifitseerida katalaas *katA* 500 bp geeni eelse ja -järgse ala. Praimerite disainiks vajalik *P. putida katA* geeni järjestus on saadud “*Pseudomonas Genome Database*” veebilehelt. Töös kasutatud praimerid on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid.

Nimetus	Järjestus	Iseloomustus
katAERI	5 - ACGAATTCCAGAACATGGCA GTGTC-3'	500 bp <i>katA</i> geeni eelse ala amplifitseerimiseks, produktiks fragment 1, kasutatud <i>katA</i> geeni eelse ja järgse ala “ <i>sewing</i> ” PCR-il. EcoRI lõikesait on allajoonitud.
katAdel	5'- GGTTCTTCTTATCACTTCGAC GGGCTCTCCATTTCGGTCT-3'	500 bp <i>katA</i> geeni eelse ala amplifitseerimiseks, produktiks fragment 1. Seondub <i>katA</i> ette suunaga geenist eemale. 5' ots on komplementaarne katAout praimeriga.
katAout	5'- GTCGAAGTGATAAGAAGAAC C-3'	500 bp <i>katA</i> geeni järgse ala amplifitseerimiseks, produktiks fragment 2. Seondub katA taha suunaga geenist eemale.
katABamHI	5'- AGGATCCAGTCCTTGTGCAGT TCGCAC-3'	500 bp <i>katA</i> geeni järgse ala amplifitseerimiseks, produktiks fragment 2, kasutatud <i>katA</i> geeni eelse ja järgse ala “ <i>sewing</i> ” PCR-il. BamHI lõikesait on allajoonitud.

Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Plasmiidi pBluescript KS ja pSNW2(Km ^R) universaalpraimer.
Reverse	5'-AACAGCTATGACCATG -3'	Plasmiidi pBluescript KS ja pSNW2(Km ^R) universaalpraimer.
3922r	5'-ATCGTCAGTGCCCCATTTCG -3'	Spetsiifiline praimer profaag 1-le, positsioon genoomis 4428225 bp- 4428207 bp
pp3848	5'-ACACCAGCCAGCACCTTTC -3'	Spetsiifiline praimer profaag 1-le, positsioon genoomis 4371385 bp – 4371403 bp

2.2.3 PCR

PCR meetodit kasutasin vajalike fragmentide amplifitseerimiseks ja konstruktide kontrollimiseks. Ühe reaktsioonisegu maht oli 20 µl ning sisaldas 1 x PCR-i puhvrit, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 ühikut Taq või Phusion Hot Start III polümeraasi ning praimereid kontsentratsiooniga 10 pmol reaktsiooni kohta. Juhul, kui kasutasin Dream Taq polümeraasi, oli segus 1 x Dream Taq green buffer (mis sisaldab juba MgCl₂) ja 0.375 ühikut Dream Taq polümeraasi. Töös kasutatud praimerid on toodud tabelis 2. PCR segudele lisasin bakteriraku kromosomaalset või eraldatud DNA-d.

PCR reaktsiooni tingimused olid 96-98 °C eelkuumutus rakumembraani lõhkumiseks 120 sekundit, 96-98 °C DNA denaturatsioon 30 sekundit, 54-58 °C praimerite seondumine 30 sekundit (olenevalt fragmendi pikkusest ning GC nukleotiidide sisaldusest), 72 °C DNA süntees 30 sekundit kuni 2 minutit 30 sekundit (olenevalt amplifitseeritava DNA pikkusest), 72 °C DNA järelsüntees 2 minutit. Kokku 25-35 tsüklit.

2.2.4 Ligaasi- ja restriksioonisegude ning PCR produktide sadestamine

Sadestamiseks viisin reaktsioonisegu mahu destilleeritud veega 100 µl-ni, lisasin 2,5 x mahtu 96% etanooli ning 1/10 mahtu 5 M NaCl. Sadenemine toimus -20 °C juures vähemalt 10 minutit. Seejärel tsentrifuugisin sademe põhja 10 minutit 4 °C tsentrifuugis täispööretel

(12000 x g) 10 minutit. Pesemiseks lisasin 150 µl 80% etanooli ning tsentrifuugisin täispöoretel (12000 x g) 5 minutit toatemperatuuril. Sademe kuivatasin temperatuuril 37°C.

2.2.5 Kompetentsete rakkude valmistamine ning elektroporatsioon

E. coli kompetentsete rakkude saamiseks kasvasin rakke üleöö 4 ml-sse LB-vedelsöötmesse 37 °C juures. Üleöö kasvanud kultuurist lahjendasin optilise tiheduseni 0,1 (OD₅₈₀) värskesse 4 ml-sse LB-vedelsöötmesse ja kasvasin rakke loksutil 2 h. Tsentrifuugisin kokku kogu rakukultuuri 1 minuti jooksul täispöoretel (12000 x g) toatemperatuuril. Pesemiseks lisasin rakkudele 700 µl 10% glütserooli, suspendeerisin ning tsentrifuugisin veel 1 minuti täispöoretel. Pesemist kordasin kokku 3 korda. Pärast pesemist suspendeerisin rakud 80 µl 10% glütseroolilahuses. Kompetentsete rakkude valmistamise ajal hoidsin nii rakke kui ka glütserooli jääl.

P. putida kompetentsete rakkude tegemiseks kasvasin rakke üleöö 4 ml LB-vedelsöötmesse 30 °C juures. Tsentrifuugisin kokku 500 µl bakterikultuuri 30 sekundi jooksul täispöoretel (12000 x g) toatemperatuuril. Pesmiseks lisasin 400 µl 300 mM sahharoosi lahust, suspendeerisin ja tsentrifuugisin veel 1 minut täispöoretel toatemperatuuril, kordasin rakkude pesemist kolm korda. Peale pesemist suspendeerisin rakud 100 µl 300 mM sahharoosi lahuses.

Elektroporatsiooni teostamiseks lisasin kompetentsetele *E. coli* või *P. putida* rakkudele kas 30 µl ligaasisegu, 4 µl pSNW2/ $\Delta katA$ plasmidi, 0,8 µl pSW(I-SceI) plasmidi, 4 µl DNA-d. Kasutatud elektroporaatorid oli firma *BioRad* "*E. coli* Pulser" ja "*Micropulser*" ning elektroporeerimine toimus pingel 2500 V. Pärast elektroporeerimist lisasin rakkudele 600 µl LB-vedelsöödet ning rakud kasvasid loksutil ligikaudu 1 h, v.a *P. putida* KT2440 rakud, kuhu oli poreeritud pSNW2/ $\Delta katA$ ning mis kasvas loksutil 4 h. *E. coli* rakud kasvasid temperatuuril 37°C ja *P. putida* rakud 30°C. Seejärel tsentrifuugisin rakud põhja täispöoretel (12000 x g) toatempeartuuril, suspendeerisin rakud ca 100 µl LB-vedelsöötmes ning plaatisin rakud selektiivtassidele.

2.2.6 DNA eraldamine agarosgeelist ning rakkudest ja DNA

restriksioonanalüüs

Agarosgeelist eraldas *ΔkatA* fragmendi, mis oli saadud PCR-il. Agarosgeelist DNA eraldamiseks kasutasin komplekti *UltraClean15 DNA Purification Kit* ning järgisin etteantud protokoll. Plasmidse DNA eraldamiseks kasutasin firma *FavorPrep* komplekti *Plasmid Extraction Mini Kit* ning järgisin etteantud protokoll.

Eraldatud DNA kontrollimiseks ning kloonimiseks kasutasin restriksioonanalüüsi. DNA restriksiooniks kasutasin firma *Thermo Scientific* FastDigest restriktase ning järgisin etteantud tingimusi. Restrikteerimisjärgsed tulemused visualiseerisin geelelektroforeesiga.

2.2.7 Geelelektroforees

Analüüsima PCR-i produkte ning restriktasidega lõigatud DNA-d, viisin läbi geelelektroforeesi. 5 µl PCR produkte või kogu restriksioonisegule lisasin foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). Värviga proovid kandsin 1% agarosgeelile 1 x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA ning pH 8,2), mis sisaldas 0,33 µg/ml etiidümbromiidi. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutasin firma *Thermo Scientific* DNA markerit *ZipRuler Express DNA Ladder 1*. Elektroforeesi viisin läbi pingel 130-150 V. DNA visualiseerisin UV valguses.

2.2.8 Kloonimine

Kloonimist kasutasin deletsioontüve konstrueerimisel soovitava fragmendi sisestamiseks vektorplasmidi. Kõigepealt valmistasin reaktsioonisegud, kus lõikasin vektorit ja sellesse kloonitavat fragmenti samade restriktasidega. Pärast lõikust töötlesin kloonimisvektorit 1 ühiku aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) 15 minuti jooksul 37°C juures, et vältida vektori iseendaga kokku lüüesumist. Restriktasid ja FastAP inaktiveerimiseks viisin läbi reaktsioonisegu 5-10 minutilise (olenevalt restriktasist, vastavalt tootja poolt toodud tingimustel) 80°C termotöötuse. Seejärel sadestasin reaktsioonisegud (vt. peatükk 2.2.4). Restriksioonifragmentide lüüesumiseks lahustasin sadestatud DNA vees ja valmistasin lüüesumisreaktsiooni segu mahus 20 µl. Lüüesumisegu sisaldas ühekordset lüüesumi puhvrit (*Thermo Scientific*), 1 mM ATP-d ja 0,5 ühikut T4 lüüesumi (*Thermo Scientific*). Reaktsioon toimus üleöö toatemperatuuril (21°C). Seejärel sadestasin lüüesumise (vt. peatükk 2.2.4) ja

lahustasin sademe 30 µl vees. Edasi elektroporeerisin 30 µl ligaasisegu *E. coli* CC118λpir või *P. putida* KT2440 rakkudesse.

2.2.9 Sekveneerimine

Sekveneerimist kasutasin deletsioontüvede konstrueerimisel kontrollina. Kõigepealt eemaldasid reaktsioonisegust kasutamata jäänud praimerid ja nukleotiidid. Selleks töötlesin produkte 1 ühiku aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) ja 2,5 ühiku eksonukleasiga ExoI (*Thermo Scientific*), reaktsioonisegu maht oli 10 µl. Reaktsioon toimus 30 minutit temperatuuril 37°C ning ensüümid inaktiveerisin 15 minuti jooksul temperatuuril 80°C. Sekveneerimiseks valmistasin proovid ette kitiga “*Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit*” (*Applied Biosystem*). Reaktsiooni võtsin 1 µl produkti, mida soovisin sekveneerida ning 1,6 pmol praimerit Forward, katAERI või katABamHI ühe reaktsiooni kohta. DNA järjestused määrati 3730xl kapillaarsekvenaatoriga (*Applied Biosystem*). Saadud järjestuste analüüsimiseks kasutasin programmi *ClustalW* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.2.10 *P. putida* katalaas katA deletsioontüve konstrueerimine

Katalaas KatA deletsioontüve tegemiseks kasutasin Martinez-Garcia ja de Lorenzo ning Wirth ja kolleegide loodud meetodit modifitseerituna (Martinez-Garcia ja Lorenzo, 2011; Wirth jt, 2019). Esmalt amplifitseerisin PCR-iga bakteri *P. putida* tüvest KT2440 fragmendi 1 (praimeriteks katAERI ja katAdel, vt. tabel 2), mis on 500 bp *katA* geenile eelnev ala ja fragmendi 2 (praimeriteks katAout ja katABamHI), mis on 500 bp geenile järgnev ala. Praimer katAdel sisaldas 5' otsast katAout praimeriga komplementaarset järjestust ning seetõttu sai praimeritega katAERI ja katABamHI teha eelnevalt tekitatud PCR produktidega “*sewing*” PCR-i, mille käigus liitusid kokku geeni eelne ja järgne fragment, tekitades ca 1000 bp pikkuse $\Delta katA$ fragmendi.

Seejärel kloonisin $\Delta katA$ fragmendi pSNW2(Km^R) plasmidi. Selleks lõikasin plasmidi ja $\Delta katA$ fragmenti firma *Thermo Scientific* restriктаasidega EcoRI ja BamHI, kloonitud plasmidi pSNW2/ $\Delta katA$ elektroporeerisin kompetentsetesse *E. coli* tüve CC118 λpir rakkudesse ning selekteerimiseks kasvasin rakke Km sisaldaval söötmel. Kloonitud plasmidi kontrollisin PCR-iga, kasutades primereid katAERI ja katABamHI. Seejärel eraldasid rakkudest plasmidse DNA (vt. peatükk 2.2.6) ning amplifitseerisin PCR-iga $\Delta katA$

fragmendi, kasutades primereid Forward ja Reverse (vt. tabel 2) ning sekveneerisin (vt. peatükk 2.2.9), et kontrollida, ega $\Delta katA$ fragmenti ei ole PCR-i käigus tekkinud mutatsioone. Seejärel viisin korrektset DNA järjestust sisaldava plasmidi elektroporatsiooniga bakterisse *P. putida* KT2440, kus see plasmid ei replitseeru, kuid integreerub kromosoomi. Moodustunud kointegraadiga rakke selekteerisin Km sisaldaval söötmel. Kointegraadi olemasolu kontrollisin PCR-ga, kasutades primereid katAERI ja katABamHI.

Järgnevalt viisin elektroporatsiooni abil rakkudesse I-SceI nukleaasi kodeeriva plasmidi pSW(I-SceI) ja kasvasin rakke LB-toluaat vedelsöötmes selleks, et indutseerida plasmidilt pSW(I-SceI) nukleaasi I-SceI, mis tekitab kaheaheelalisi lõikeid I-SceI restriksioonisaitides kromosoomi integreerunud pSNW2/ $\Delta katA$ plasmidis 45 min temperatuuril 30°C. Seleksiooniks kasutasin bensüülpenitsilliini (Bp) ning toluaati sisaldavat LB-söödet. Söötmetele lisatud meta-toluaadi, mis on I-SceI promootori induktor kontsentratsioon oli 3 mM. Katkete tekkimise tagajärjel toimub homoloogiline rekombinatsioon $\Delta katA$ fragmendi ja kromosoomis olevate *katA* geeni eelse või *katA* järgse ala vahel. Kui homoloogiline rekombinatsioon toimub, siis pole tüved enam võimelised Km juuresolekul kasvama ja nendest tüvedest pooltel juhtudel deleteerub *katA* geen ja pooltel jääb *WT* lookus. Selleks, et näha, kas homoloogiline rekombinatsioon on toimunud ja plasmid välja rekombineerunud, tegin rakkudele PCR analüüsi kasutades primereid katAERI ja katABamHI. Seejärel vabanesin deletsioonitüves pSW(I-SceI) plasmidist kasvatades baktereid antibiootikumita 5 ml LB-vedelsöötmes, edasi lahjendasin 20 μ l üleöö kultuuri uude LB-vedelsöötmesse, nii 10 korda. Plasmidi kadumist kontrollisin paralleelkõlviga LB tassile ja LB-Bp tassile. Konstrueeritud tüvesid kontrollisin ka sekveneerimisega.

2.2.11 Endogeense ROS-i detekteerimine rakkudest

Rakusisese ROS-i tuvastamiseks kasutasin Akkaya ja kolleegide ning Svenningsen ja ta kolleegide välja töötatud metoodikat (Svenningsen jt, 2015; Akkaya jt, 2018). Bakteri *P. putida* rakkudest endogeense ROS-i detekteerimiseks kasvasin rakke 1 x glc CAA vedelsöötmes loksutil üleöö temperatuuril 30°C. Seejärel tegin rakukultuurist lahjenduse värskesse 50 ml glc CAA vedelsöötmesse nii, et kultuuri optiline tihedus oleks 0,2 (OD_{600}). Rakud kasvasid 1 h 30°C loksutil (140 rpm), pärast mida mõõtsin uuesti kultuuri optilise tiheduse (OD_{600}). Seejärel jagasin kultuuri 3x15 ml kolbidesse, kus esimene oli kontroll, teise lisasin 20 mM PQ-d lõppkontsentratsiooniga 0,15 mM ning kolmandasse 30% H_2O_2 -te lõppkontsentratsiooniga 1,5 mM. Seejärel jagasin iga 15 ml kolvi 5 ml kaupast steriilsetesse

katseklaasidesse ehk igast kolvist sai kolm paralleeli katseklaasis. Kultuuri panin kasvama 30°C loksutile (180 rpm). Kahe tunni möödudes tsentrifuugisin (12000 x g) 1 ml rakukultuuri põhja, eemaldasın supernatandi ja võtsın rakud üles 1 ml 1 x M9 puhvris. Lisasin igale proovile 20 µl (1 mg/ml, DMSO-s) DCFH-DA (*Cayman Chemical*) värvilahust ja lasin mõjuda 30 min pimedas toatemperatuuril. DCFH-DA on rakumembraani läbiv ester, mis hüdrolyüsitakse rakkudes esteraaside poolt dihüdroksü-DCFH-ks, mis ei pääse rakkudest välja. DCFH on tundlik ROS-idele ja oksüdeeritakse tugevalt fluoreseeruvaks 2,7-diklorofluoressiiniks (DCF). Pärast 30 minutist inkubatsiooni pimedas kandsın 100 µl proovi mikrotiiterplaadile ning mõõtsın rakukultuuri optilise tiheduse (OD₆₀₀) ja fluorestsentsi intensiivsuse (emissiooni lainepikkusel 525 nm ja ergastus lainepikkusel 485 nm) kasutades *Tecan i-control*.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Oksüdatiivse stressi tundliku *P. putida* sensortüve konstrueerimine ja iseloomustamine

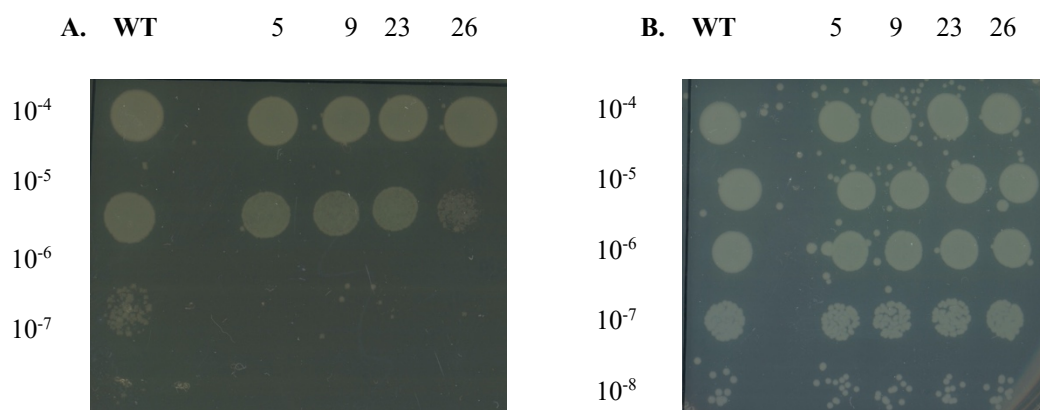
Katalaas on oluline ensüüm, mis katalüüsib vesinikperoksiidi lagunemist veeks ja hapnikuks (Kim jt, 2019). *P. putida* genoomis on 4 katalaasi kodeerivat geeni: PP_0015 ehk *katE*, PP_0481 ehk *katA*, PP_2887 ja PP_3668 ehk *katB*. Transkriptoomiksiga on näidatud, et bakteri *P. putida* tüve KT2440 rakkudes on oksüdatiivse stressi korral tugevalt aktiveeritud vaid *katA* geeni transkriptsioon (Yeom jt, 2012, Bojanovič jt, 2017). Selleks, et oksüdatiivset stressivastust hinnata bakteri *P. putida* tüve KT2440 rakkudes, konstrueerisin *P. putida katA* deletsioontüve. Deletsioontüve tegemiseks kasutasın kirjanduses avaldatud meetodit (vt materjal ja metoodika; Martinez-Garcia ja Lorenzo, 2011; Wirth jt, 2019). *P. putida* tüvest KT2440 sain neli sõltumatut *katA* deletsioonmutanti (tähistatud numbritega 5, 9, 23 ja 26), mida kontrollisin PCR ja sekveneerimisega ning lisaks kasvu järgi ROS-i tekitavate kemikaalide juuresolekul.

2.3.2 *P. putida katA* deletsioontüvede kasv ROS-i tekitavate kemikaalide juuresolekul

P. putida katA deletsioontüvede funktsionaalsuse kontrolliks kasvasın rakke reaktiivseid hapnikuühendeid tekitavate kemikaalide juuresolekul. Kemikaalid, mida kasutasın, olid

parakvaat (PQ), vesinikperoksiid (H_2O_2), ciprofloxacín (cipro) ja nitroquinoline (NQO). Bakteritüvede kasvu hindasin pärast 24 h inkubatsiooni 30 °C juures.

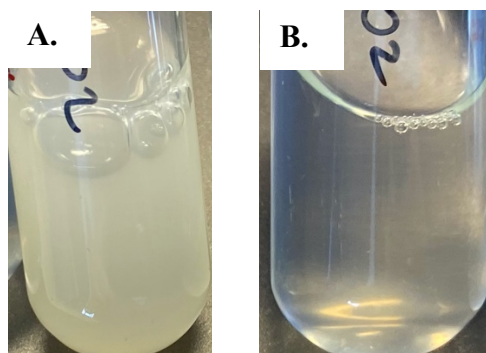
Endogeenset ehk rakusisest ROS-i tekitab parakvaat. Parakvaat on kemikaal, mis rakus reageerib hapnikuga ning tekitab superoksiidi aniooni (Fridovich, 1978). Tekkinud superoksiidi konversiooni vesinikperoksiidiks ja hapnikuks katalüüsib superoksiidi dismutaas (Fridovich, 1975), mis on olemas nii metsiktüves kui ka $\Delta katA$ tüvedes. Superoksiidi kahjutuks tegemise käigus tekkinud vesinikperoksiidi aga eemaldab *P. putida* rakkudes põhiliselt katalaas KatA, mis puudub $\Delta katA$ tüvedes. *P. putida* metsiktüve ja $\Delta katA$ kasv 0,02 mM parakvaadi juuresolekul on esitatud joonisel 6. Tundlikkust testisin 0,01 mM, 0,02 mM ja 0,1 mM parakvaadiga LB-tardsöötmele, kuid kõige paremini oli efekt näha 0,02 mM parakvaadiga tassidel, mis on esitatud joonisel 6. Võrreldes metsiktüvega on katalaasi deletsioontüvi tundlikum parakvaadile, kuna 0,02 mM parakvaadiga tassil puudub deletsioontüvel kasv 10^{-7} lahjendustäpis, samas kui metsiktüvi seal kasvab. Seega, bakteris *P. putida* KT2440 on katalaas KatA olemasolu oluline parakvaadi tekitatud ROS-ide talumises.



Joonis 6: *P. putida* metsiktüve ja $\Delta katA$ tüvede kasv 0,02 mM parakvaati sisaldaval LB-tardsöötmele (A) ja LB-tardsöötmele (B). Vertikaalselt on toodud lahjendused ning horisontaalselt *P. putida* tüved. WT on *P. putida* KT2440 metsiktüvi, 5, 9, 23 ja 26 on sõltumatult saadud $\Delta katA$ tüved. Pilt on tehtud pärast 24 h inkubatsiooni temperatuuril 30°C. Katset on korratud viis korda.

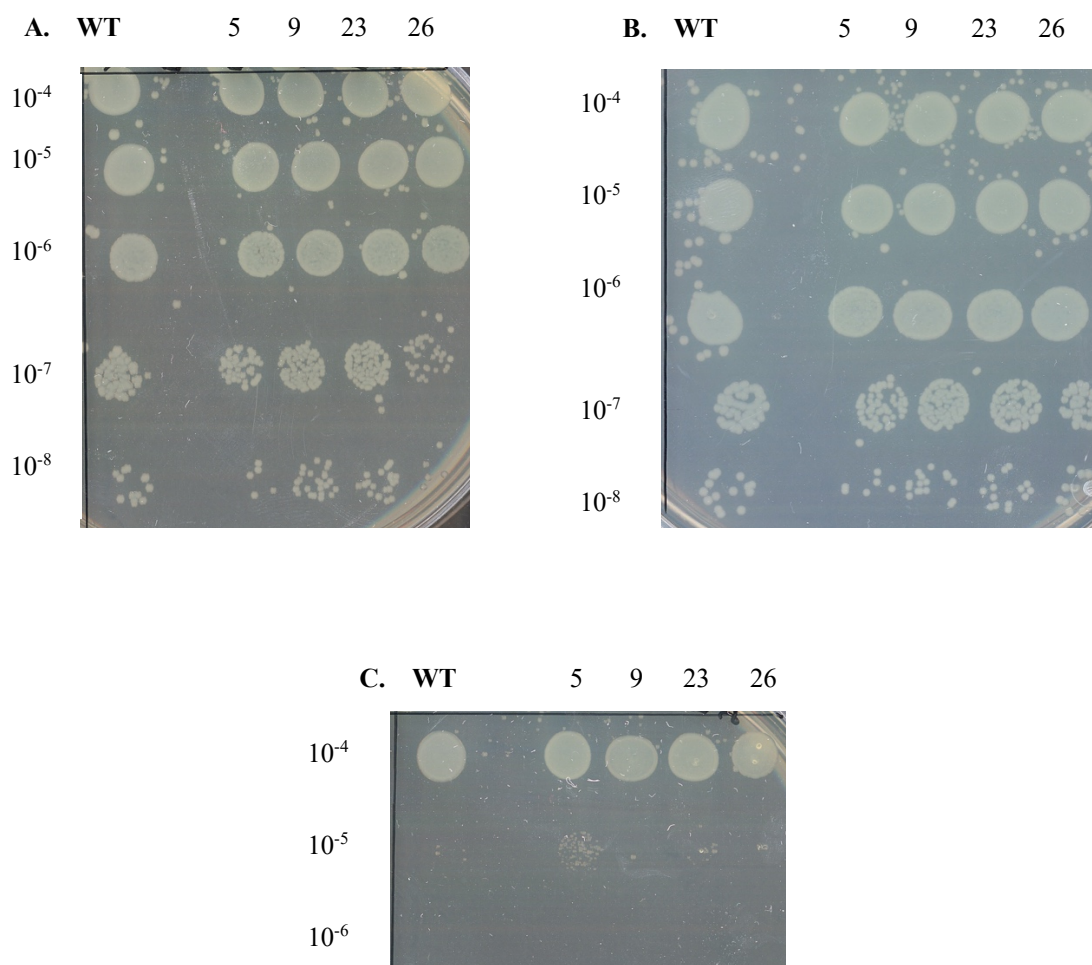
Lisaks hindasin *P. putida* $\Delta katA$ tüve eksponentsiaalse faasi rakkude kasvu eksogeense 1,5 mM vesinikperoksiidi juuresolekul. Selleks lahjendasin *P. putida* metsiktüve ja $\Delta katA$ üleoökultuure glcCAA vedelsöötmesse nii, et bakterikultuuride optiline tihedus lainepikkusel 600 nm oleks 0,2 ning kasvatasin rakke 1h temperatuuril 30°C. Seejärel lisasin rakkudele H_2O_2 lõppkontsentratsiooniga 1,5 mM ning kasvatasin rakke veel 2 h. Jooniselt 7 on näha, et aktiivselt kasvavates *P. putida* katalaas deletsioontüve rakkudes inhibeeris 1,5 mM H_2O_2

lisamine kasvu rohkem kui metsiktüvel. Tulemus on ootuspärane, kuna kataaas KatA on oluline H_2O_2 eemaldamiseks rakkudest (Kim jt, 2019) ja KatA puudumine muudab *P. putida* rakud vesinikperoksiidile tundlikumaks ning rakutihedus jääb madalaks.



Joonis 7: *P. putida* metsiktüve (A) ja $\Delta katA$ 5 (B) kasv 1,5 mM H_2O_2 juuresolekul. Pilt on tehtud 2 h pärast vesinikperoksiidi lisamist. Katset viidi läbi üks kord.

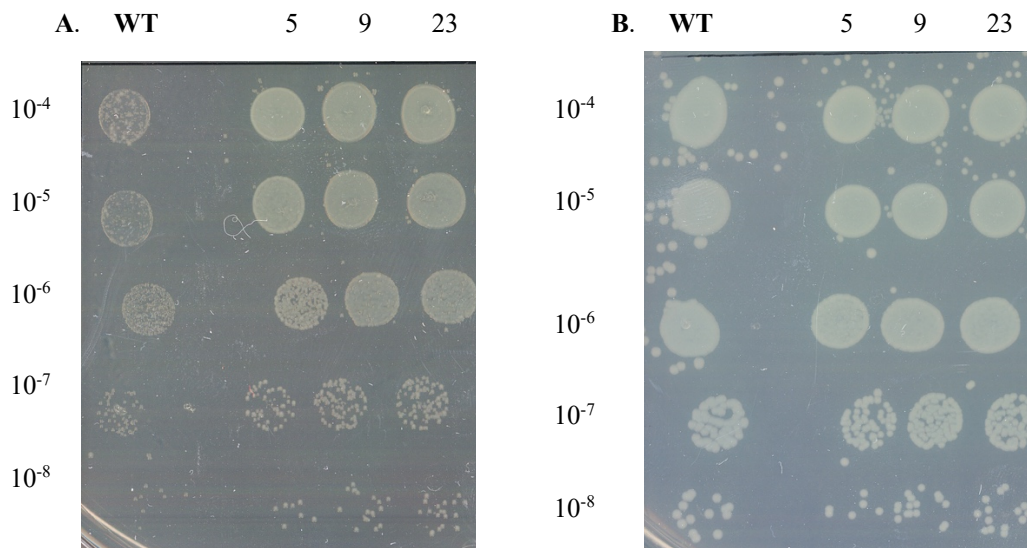
Kuid vesinikperoksiidi sisaldaval LB-tardsöötmele $\Delta katA$ kasvu inhibeeriv efekt võrreldes metsiktüvega välja ei tulnud. H_2O_2 inhibeeris kasvu nii metsiktüvel kui ka kataaas deletsioontüvedel ühte moodi. Vesinikperoksiidi kontsentratsioon tardsöötmes oli 100 μM , 200 μM ja 250 μM . Kuna *WT* ja mutant käitusid sarnaselt, siis on tulemuste illustreerimiseks esitatud pildid vaid 100 μM ja 250 μM H_2O_2 . 250 μM H_2O_2 inhibeeris kasvu deletsioon- ja metsiktüvel juba 10^{-5} lahjenduses, samas kui 100 μM H_2O_2 juuresolekul oli näha mõlema tüve kasv ka 10^{-8} lahjenduses (vt. joonis 8). 200 μM H_2O_2 juuresolekul oli näha, et deletsioontüvede 9 ja 26 kasv oli inhibeeritud juba 10^{-6} lahjenduses. Antud katse tingimustel ei näinud me erinevust mutandi ja metsiktüve kasvus vesinikperoksiidi sisaldaval LB-tardsöötmele. Kuna katset on teostatud vaid üks kord, siis katsest järeltulemuste tegemiseks tuleks katset veel korrata ja proovida varieerida H_2O_2 kontsentratsiooni söötmes.



Joonis 8: *P. putida* metsiktüve ja $\Delta katA$ tüvede kasv 100 µM vesinikperoksiidi sisaldaval LB-tardsöötmel (A), LB-tardsöötmel (B) ja 250 µM vesinikperoksiidi sisaldaval LB-tardsöötmel (C). Vertikaalselt on toodud lahjendused ning horisontaalselt *P. putida* tüved. WT on *P. putida* KT2440 metsiktüvi, 5, 9, 23 ja 26 on sõltumatult saadud $\Delta katA$ tüved. Pilt on tehtud pärast 24 h inkubatsiooni temperatuuril 30°C. Katset on läbi viidud üks kord.

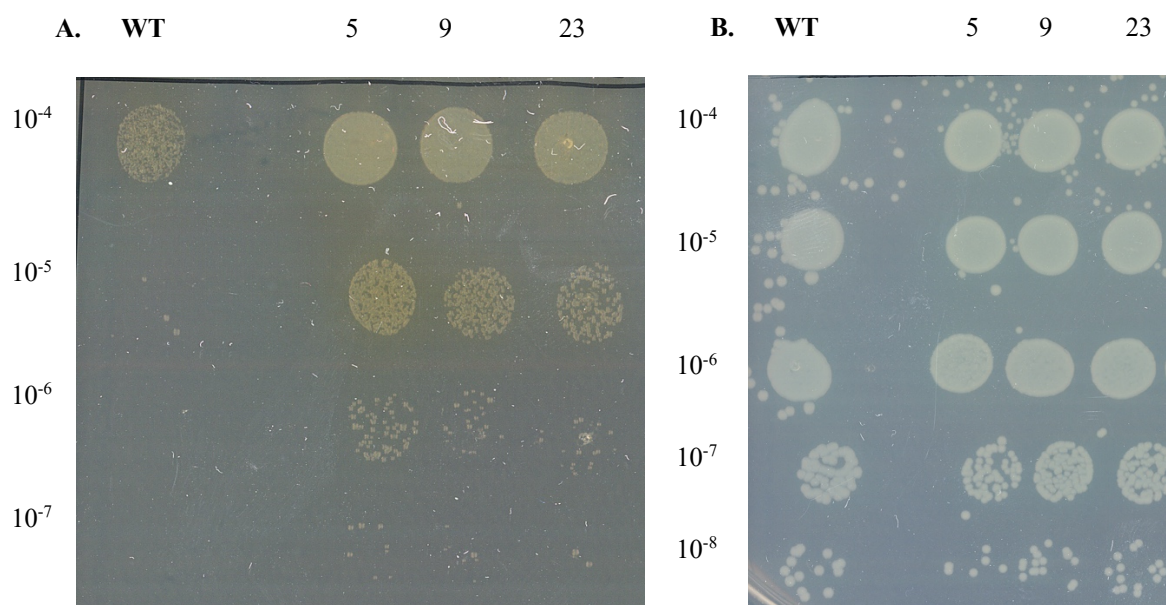
Ciprofloxacin oli kolmas kemikaal, millel kontrollisin *P. putida* $\Delta katA$ kasvu. Ciprofloxacin on fluorokinoloon, antibiootikum, mis inhibeerib DNA güraasi ja seega ei toimu DNA replikatsiooni ja ka transkriptsiooni, mis omakorda viib ROS-ide akumulatsioonini, kuna ei suudeta sünteesida kaitseensüüme ([pubchem](#); Hong jt, 2019). Ciprofloxacini kontsentratsioon tardsöötmes oli 0,03 µg/ml. Üllatavalt kasvasid tardsöötmel $\Delta katA$ tüved paremini kui metsiktüvi (vt. joonis 9). Erinevus võib tuleneda sellest, et kas katalaasi deletsioontüve tegemise käigus või hilisemates kasvatamise etappides võivad tekkida genoomi mutatsioonid, mis võimaldavad *P. putida* $\Delta katA$ tüvel paremini kasvada cipro-l või efektiivsemalt antibiootikumi rakkudest välja pumbata. Varasemalt on kirjanduses näidatud, et güraaside

gyrA geenis 83. positsioonis treoniini asendumine isoleutsiiniga ja *gyrB* geenis 469. positsioonis glutamiinhappe asendumine asparagiinnhappega annab *P. putida* rakkudele resistentsuse fluorokinoloonidele, kuhu kuulub ka ciprofloxacini (Horii jt, 2005). Lisaks on kirjanduses näidatud, et *Pseudomonas aeruginosa* $\Delta katA$ tüvedes võivad subletaalsed ciprofloxacini kogused tõstavad ciprofloxacini resistentsete rakkude hulka tänu sellele, et *katA* puudumisel on mutatsioonisagedus suurenenud (Ahmed jt, 2019).



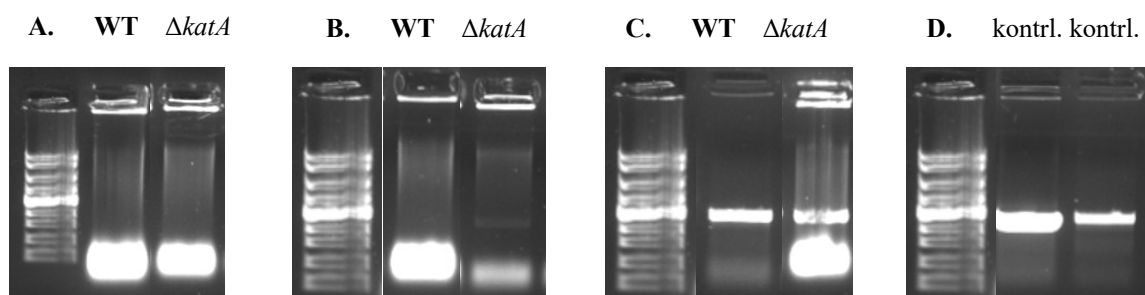
Joonis 9: *P. putida* metsiktüve ja $\Delta katA$ tüvede kasv 0,03 µg/ml ciprofloxacini sisaldaval LB-tardsöötmel (A) ja LB-tardsöötmel (B). Vertikaalselt on toodud lahjendused ning horisontaalselt *P. putida* tüved. WT on *P. putida* KT2440 metsiktüvi, 5, 9 ja 23 on sõltumatult saadud $\Delta katA$ tüved. Pilt on tehtud pärast 24 h inkubatsiooni temperatuuril 30°C. Katset on korratud kaks korda.

Viimane kemikaal, millel hindasin kasvu oli nitroquinoline, mis inhibeerib nukleiinhapete sünteesi (Bond jt, 1970). NQO suudab endaga liita ühe elektroni ja samas kanda seda edasi hapnikule, tekitades superoksiid anioone (Arima jt, 2006). NQO kontsentratsioon LB-tardsöötmes oli 240 µM ja 280 µM. Katsest selgus, et *katalaasi* deletsioontüved talusid paremini antibiootikumi kui metsiktüvi (vt. joonis 10).



Joonis 10: *P. putida* metsiktüve ja $\Delta katA$ tüvede kasv 280 μM nitroquinoline sisaldaval LB-tardsöötmel (A) ja LB-tardsöötmel (B). Vertikaalselt on toodud lahjendused ning horisontaalselt *P. putida* tüved. WT on *P. putida* KT2440 metsiktüvi, 5, 9 ja 23 on sõltumatult saadud $\Delta katA$ tüved. Pilt on tehtud pärast 24 h inkubatsiooni temperatuuril 30°C. Katset on korratud kaks korda.

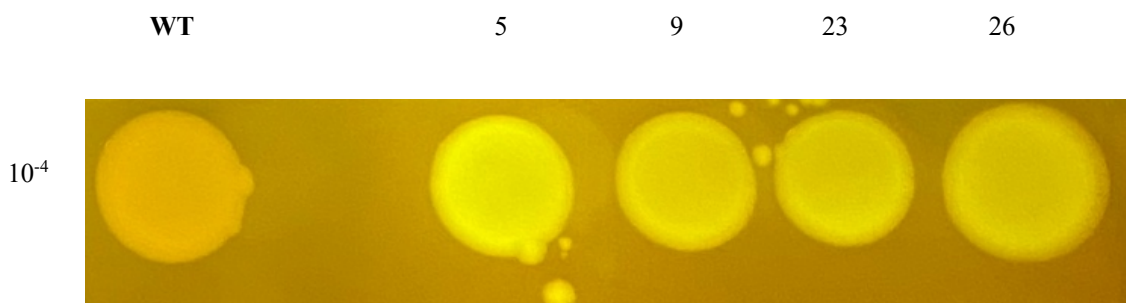
Varasemalt on näidatud, et DNA-d kahjustavad ja ROS-e tekitavad kinoloonide rea antibiootikumid, nagu ka nitroquinoline, indutseerivad *P. putida* genoomist profaagide väljumist (Martínez-García jt, 2015). Seetõttu tegin PCR analüüsi, kontrollimaks, kas profaag P1 on rakkude genoomi olemas või lahkunud. PCR analüüsi tegin rakkudele, mis kasvasid LB-, 0,01 mM PQ ja 240 μM NQO sisaldavatel LB-tardsöötmel. LB- ja PQ-tassidelt võetud rakkudes ei olnud profaag P1 lahkunud ei WT ega $\Delta katA$ tüves, samas NQO tassilt võetud rakkudes oli näha profaagi lahkumine nii metsiktüvel kui ka $\Delta katA$ tüvel (vt. joonis 11). Kuna $\Delta katA$ tüvi kasvab NQO-l siiski paremini kui metsiktüvi, mille kasv on inhibeeritud juba 10^{-5} lahjendustäpis (vt. joonis 10), siis võib oletada, et katalaas KatA puudumisel sageneb profaag P1 lahkumine. Sagedasem profaag P1 lahkumine aga võib $\Delta katA$ tüve rakkudele anda kasvueelise NQO-l võrreldes metsiktüvega, kuid selle hüpoteesi kontrollimiseks oleks vaja mõõta profaag P1 lahkumise sagedus nii metsitüves kui ka katalaas $\Delta katA$ deletsioontüves.



Joonis 11: *P. putida* metsiktüves ja $\Delta katA$ tüvest profaag P1 lahkumise tuvastamine PCR meetodil. PCR analüüs, kus rakud on võetud LB-tassilt (A), 0,01 mM PQ-tassilt (B) ja 240 μ M NQO-tassilt (C) ning positiivne kontroll *P. putida* $\Delta P1$ rakud, kus profaag P1 on genoomist lahkunud (D).

2.3.3 *P. putida katA* deletsioontüvede fluorestsents ja siderofooride tootmine

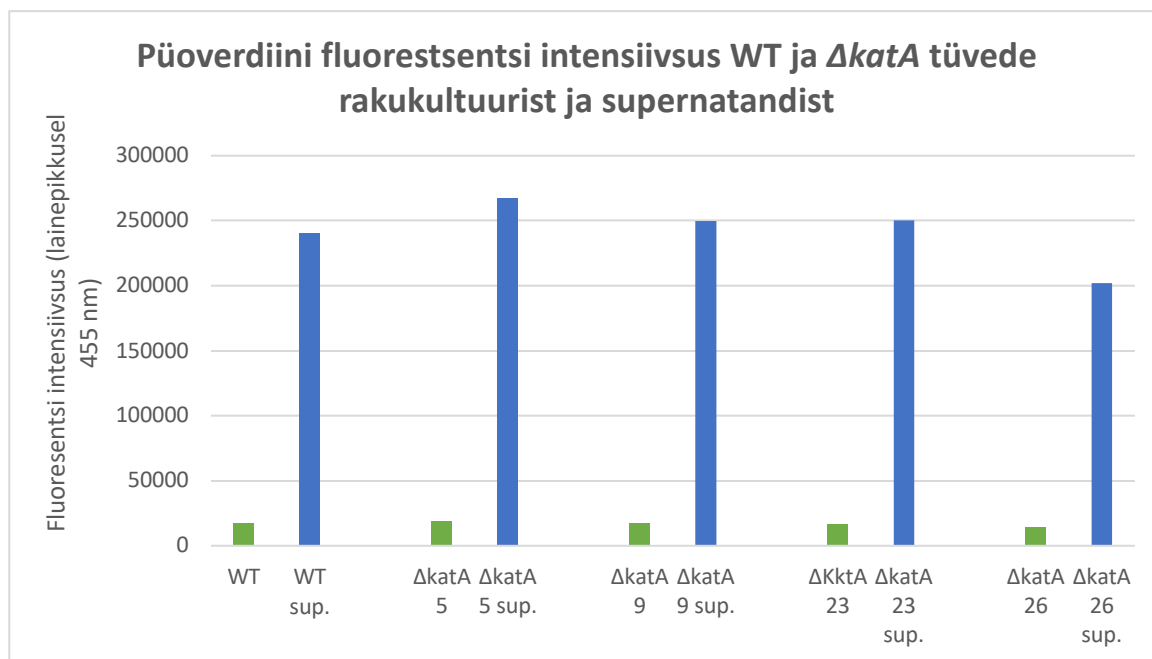
Täheleasin, et nii LB-söötmel kui ka PQ-tardsöötmel kasvamisel *P. putida* katalaas A deletsioontüved fluorestseerusid sinises valguses (vt. joonis 12).



Joonis 12: *P. putida* $\Delta katA$ tüvede fluorestsents, mis puudub metsiktüvel. Tulemus on visualiseeritud sinises valguses, kus on näha $\Delta katA$ tüvede rohekas-kollane fluorestsents. Pilt on tehtud pärast 24 h inkubatsiooni temperatuuril 30°C. Katset on korratud viis korda.

Üheks põhjuseks, miks bakter *P. putida* $\Delta katA$ tüved sinises valguses helendavad, võib olla see, et katalaas KatA puudumisel sünteesivad ja sekreteerivad rakud rohkem siderofoore, mis sinises valguses helendavad. Kuna rauaioonid on vajalikud elektrontransportahelas, siis on bakterites olemas siderofoorid, mida rakud sekreteerivad raua sidumiseks ja omastamiseks keskkonnast (Griffiths, 1993). Bakteril *P. putida* tüvel KT2440 on üheks selliseks, kuid mitte ainsaks siderofooriks püoverdiin, mida produtseeritakse rauanälja korral (Henriquez jt, 2019). Püoverdiini emissiooni lainepikkus on 460 nm ja ergastus 400 nm juures (Xiao ja Kisaalita, 1995). Selleks, et välja selgitada, kas *P. putida* $\Delta katA$ rakkude fluorestsentsi põhjuseks on

suurenenud püoverdiini sekretsioon, mõõtsin nii WT kui ka $\Delta katA$ rakukultuurist kui rakuvaba kasutatud söötme ehk supernatandist fluorestsentsi intensiivsust eelnevalt mainitud, kuid modifitseeritud lainepikkustel. Tulemustes ei ilmnenud erinevusi *P. putida* metsiktüve ja katalaas deletsioontüvede vahel (vt. joonis 12). Samas jooniselt 12 on näha, et fluorestseeruv ühend on supernatandis. Kuna WT ja $\Delta katA$ rakukultuurist ja supernatandist mõõdetud fluorestsentsi intensiivsus on sarnane, siis järelikult pole püoverdiin see molekul, mis tekitab $\Delta katA$ tüvedel sinises valguses fluorestseerumist.



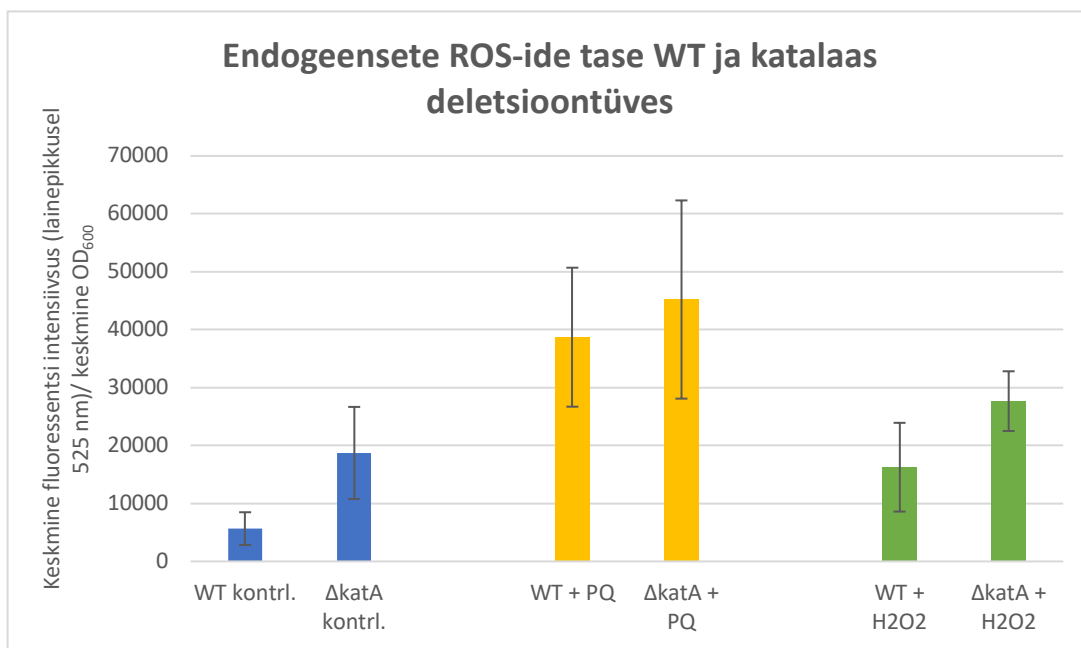
Joonis 12: Fluorestsentsi intensiivsus mõõdetud *P. putida* metsiktüve ja $\Delta katA$ deletsioontüvede rakukultuurist ja supernatandist. Püoverdiini emisiooni lainepikkus 455 nm ja ergastamise lainepikkus 398 nm. Roheline tulp väljendab fluorestsentsi intensiivsust rakukultuuris ja sinine tulp supernatandis. Fluorestsentsi intensiivsus on mõõdetud peale inkubatsiooni 24 h temperatuuril 30°C. Katset on korratud ühe korra. Rakukultuuridest on tehtud kaheksa paralleeli, supernatantidest kuus paralleeli.

2.3.4 *P. putida* $\Delta katA$ sensortüve ROS-ide tase oksüdatiivse stressi korral

Selleks, et kontrollida, kas konstrueeritud $\Delta katA$ sensortüves suureneb ROS-ide tase oksüdatiivse stressi korral, mõõtsin rakusiseseid ROS-e fluorestsseeruva värviga 2,7-diklorodihüdrofluoressiin diatsetaat (DCFH-DA). Seda metoodikat on kasutatud *P. putida* endogeensete ROS-ide mõõtmiseks (Akkaya jt, 2018). DCFH-DA värv siseneb rakkudesse ja hüdrolüüsitakse raku esteraaside poolt dihüdrosü-DCFH-ks, mis ei pääse rakkudest välja ning rakusisesed ROS-id oksüdeerivad selle tugevalt fluorekseeruvaks ühendiks 2,7-diklorofluoressiiniks (DCF) (Rastogi jt, 2010; Dikalov ja Harrison, 2014). DCFi

detekteerimiseks on vajalik emissiooni lainepikkus 523 nm ja ergastuslainepikkus 502 nm. Meie uurimisgrupis on varasemalt korra proovitud DCFi teket mõõta statsionaarse kasvufaasi *P. putida* rakkudes, kuid siis ei suudetud fluorestsentsi tuvastada. Mina mõõtsin DCFi teket metsiktüves ja $\Delta katA$ deletsioontüves eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest oksüdatiivset stressi põhjustava kemikaali juuresolekul ja ilma (joonis 13). Oksüdatiivse stressi tekitasin rakkudele kasutades kahte kemikaali, superoksiidi aniooni tekitav parakvaat ja vesinikperoksiid. Vesinikperoksiidi kontsentratsioon vedelsöötmes oli 1,5 mM, mis on võetud Svenningsen ja kolleegide uurimistööst (Svenningsen jt, 2015), samuti ka parakvaadi kontsentratsioon, mis kasvukeskkonnas oli 0,15 mM, kuid mida on modifitseeritud.

Joonisel 13 esitatud DCFi mõõtmise tulemusest selgus, et fluorestseeruva DCFi teket on võimalik *P. putida* eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes tuvastada ning meetodikat saab kasutada rakusisest ROS-ide mõõtmiseks. *P. putida* $\Delta katA$ tüvel, kuhu ei ole lisatud värvi 2,7-diklorodihüdrufluoressiini diatsetaati, on fluorestsentsi intensiivsus ligikaudu kaks korda suurem kui metsiktüvel, mis võib tuleneda $\Delta katA$ suurenenud fluorestsentsi tasemest. Katse tulemustest on näha, et $\Delta katA$ deletsioontüves suureneb endogeensete ROS-ide tase vastusena nii parakvaadile kui ka vesinikperoksiidile metsiktüvega võrreldavalt. Seega nendel katsetingimustel ei näinud me oluliselt tõusnud ROS-ide hulka katalaasi puudumisel. Selle põhjuseks võib olla, et katalaasi deletsioontüves on veel kolm katalaasi, mis võivad kompenseerida katalaasi puudumist ja seetõttu me ei näe katalaasi deletsioontüves parakvaadi ja vesinikperoksiidi juuresolekul ROS-ide suurt tõusu. Teine võimalus, miks metsiktüvi ja katalaasi deletsioontüvi käituvad sarnaselt on see, et katse tingimused vajaksid veel optimeerimist (nt. aeg kui kaua rakud on kemikaalidele eksponeeritud, kemikaali kontsentratsioon), fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmishetkel võis ROS-ide tase juba rakkudes langeda (Svenningsen jt, 2015). Samas on tulemusest näha, et võrreldes vesinikperoksiidiga tekitab superoksiidi anioone produtseeriv parakvaat suurema rakusiseste ROS-ide hulga nii metsiktüvel kui ka katalaasi deletsioontüvel.



Joonis 13: Endogeensete ROS-ide tase WT ja katalaas $\Delta katA$. Fluoresentsi intensiivsuse ja OD₆₀₀ suhe mõõdetud *P. putida* metsiktüves ja deletsioontüves $\Delta katA$ 5. Tulbad iseloomustavad tüvede keskmise fluoressentsi intensiivsuse ja keskmise optilise tiheduse (mõõdetuna 600 nm juures) suhet. Rakkude värvimiseks on kasutatud 2,7-diklorodihüdrofluoresiin diatsetaati. Kolmest bioloogiliselt sõltumatust katsest on esitatud ühe katse keskmised tulemused koos 95% usalduspiiridega.

KOKKUVÕTE

Aeroobsetel organismidel on olemas mehhanismid, et kaitsta end oksüdatiivse stressi eest, mida põhjustavad rakkudes nii eksogeensed ühendid kui ka endogeensed protsessid, mis tekitavad reaktiivseid hapnikuühendeid (ROS). Reaktiivsed hapnikuühendid nagu superoksiidi anioon ($O_2^{\cdot-}$), vesinikperoksiid (H_2O_2) ja hüdroksüül radikaal ($\cdot OH$) võivad rakkudes kahjustada makromolekule nagu DNA, RNA, valgud ja lipiidid. Esmaseks kaitseks rakkudes on ensüümid, mis hapniku redutseerimise vaheühendeid katalüütiliselt eemaldavad. Superoksiidi dismutaasid, katalaasid ja alküülhüdoperoksiidi reduktaasid vastutavad ROS-ide neutraliseerimise eest. Superoksiidi dismutaasid eemaldavad superoksiidi aniooni, katalaasid eemaldavad vesinikperoksiidi ning mõlema ekspressiooni kontrollivad regulaatorid FinR, HexR ja OxyR. OxyR reguleerib katalaaside KatA ja KatB ekspressiooni bakteris *Pseudomonas putida*. *katA* geen on tugevalt indutseeritud oksüdatiivse stressi korral ning selle transkriptsiooni reguleeritakse vastusena H_2O_2 -le.

Varasemalt on näidatud, et oksüdatiivse stressi korral on bakteris *Pseudomonas putida* põhiliselt ekspresseeritud katalaas KatA. Minu uurimistöö eesmärk oli konstrueerida *Pseudomonas putida* tüvest KT2440 katalaas *katA* deletsioontüvi, millega oleks võimalik tuvastada oksüdatiivse stressi olemasolu ning mis edaspidi võimaldaks meie uurimisgrupil hinnata teatud kemikaalide oksüdatiivse stressi tekitamise võimet.

Käesoleva töö käigus jõudsin järgmiste tulemusteni:

1. konstrueerisin *Pseudomonas putida* tüvest KT2440 katalaas *katA* deletsioontüve.
2. iseloomustasin konstrueeritud *P. putida* $\Delta katA$ bakteritüve kasvu oksüdatiivset stressi esilekutsuvate kemikaalide nagu parakvaat, vesinikperoksiid, nitroquinoline ja ciprofloxacini juuresolekul. Katalaas KatA puudumine muudab *P. putida* rakud tundlikumaks parakvaadi ja vesinikperoksiidi suhtes, kuna mõlemad inhibeerisid *P. putida* $\Delta katA$ tüve kasvu rohkem võrreldes metsiktüvega. Samas KatA puudumine soodustas *P. putida* kasvu nitroquinolinel ja ciprofloxaciniil.
3. Kasutades 2,7-diklorodihüdrofluoresiini diatsetaati tuvastasin *P. putida* eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes endogeensete ROS-ide tekke nii parakvaadi kui ka vesinikperoksiidi lisamisel. Katalaas KatA puudumine ei mõjutanud olulisel määral parakvaadi ja H_2O_2 tekitatud endogeensete ROS-ide taset *P. putida* rakkudes.

Construction and characterization of the soil bacterium *Pseudomonas putida* catalase KatA defective strain

Triin Uussaar

SUMMARY

Aerobic organisms have to have mechanisms to protect themselves against oxidative stress, which arises in cells from both external agents and endogenous process that generate reactive oxygen species (ROS). Reactive oxygen species such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) can damage macromolecules like DNA, RNA, proteins and lipids in cells. The primary defense is provided by enzymes that catalytically scavenge the intermediates of oxygen reduction. Superoxide dismutases, catalases and alkyl hydroperoxide reductases are responsible for neutralizing ROS. Superoxide dismutases eliminates superoxide anion, catalases remove hydrogen peroxide and both are controlled by regulators FinR, HexR and OxyR. OxyR regulates the expression of catalases KatA and KatB in *Pseudomonas putida*. *katA* gene is highly induced under oxidative stress and transcription of it is regulated in response to H_2O_2 .

It has been previously shown that under oxidative stress only the catalase *katA* is highly expressed in *Pseudomonas putida*. The aim of my study was to construct a catalase *katA* deletion strain of *Pseudomonas putida* KT2440 that could detect the presence of oxidative stress and which would allow our research group to evaluate the ability of certain chemicals to cause oxidative stress.

The results of this work are concluded as follows:

1. I constructed a catalase *katA* deletion strain of *Pseudomonas putida* KT2440.
2. I characterized the growth of the constructed bacterial strain in the presence of oxidative stress-inducing chemicals such as paraquat, hydrogen peroxide, nitroquinoline and ciprofloxacin. The absence of catalase KatA makes *P. putida* cells more sensitive to paraquat and hydrogen peroxide as both inhibited the growth of *P. putida* $\Delta katA$ more than the wild-type. However, the absence of KatA promoted the growth of *P. putida* on nitroquinoline and ciprofloxacin.
3. Using 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, I detected the formation of endogenous ROS in *P. putida* exponential growth phase cells upon addition of both paraquat and hydrogen peroxide. The absence of catalase KatA did not significantly affect the level of endogenous ROS induced by paraquat and H_2O_2 in *P. putida* cells.

KIRJANDUSE LOETELU

1. Akkaya, Özlem, Danilo R. Pérez-pantoja, and Belén Calles. 2018. "Crossm The Metabolic Redox Regime of Pseudomonas Putida Tunes Its." 9(4):1–16.
2. Ahmed, Marwa N., Andreas Porse, Ahmed Abdelsamad, Morten Sommer, Niels Høiby, and Oana Ciofu. 2019. "Lack of the Major Multifunctional Catalase Kata in Pseudomonas Aeruginosa Accelerates Evolution of Antibiotic Resistance in Ciprofloxacin-Treated Biofilms." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63(10):1–12.
3. Anderson, A. J. and C. D. Miller. 2001. "Catalase Activity and the Survival of Pseudomonas Putida, a Root Colonizer, upon Treatment with Peracetic Acid." *Canadian Journal of Microbiology* 47(3):222–28.
4. Arima, Yaeno, Chikako Nishigori, Toru Takeuchi, Shigenori Oka, Kanehisa Morimoto, Atsushi Utani, and Yoshiki Miyachi. 2006. "4-Nitroquinoline 1-Oxide Forms 8-Hydroxydeoxyguanosine in Human Fibroblasts through Reactive Oxygen Species." *Toxicological Sciences* 91(2):382–92.
5. Bagdasarian M., Lurz R., Rückert B., Franklin F.C.H., Bagdasarian M.M., Frey J., Timmis K.N. 1981. Specific purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*. 1981;16:237–247.
6. Betteridge, D. J. 2000. "What Is Oxidative Stress?" *Metabolism: Clinical and Experimental* 49(2 SUPPL. 1):3–8.
7. Bojanovič, K., D'Arrigo, I., Long. K., S 2017. "Global Transcriptional Responses To Osmotic, Oxidative and Imipenem Stress Conditions In *Pseudomonas putida*." 83(7):1–18.
8. Bond, T. J., K. L. Young, and T. T. Andrus. 1970. "Characteristics of Growth Inhibition of Lactobacillus Casei by 4-Nitroquinoline-n-Oxide." *Applied Microbiology* 20(4):536–38.

9. Campilongo, Rosaria, Rowena K. Y. Fung, Richard H. Little, Lucia Grenga, Eleftheria Trampari, Simona Pepe, Govind Chandra, Clare E. M. Stevenson, Davide Roncarati, and Jacob G. Malone. 2017. "One Ligand, Two Regulators and Three Binding Sites: How KDPG Controls Primary Carbon Metabolism in *Pseudomonas*." *PLoS Genetics* 13(6):1–30.
10. Chelikani, P., I. Fita, and P. C. Loewen. 2004. "Diversity of Structures and Properties among Catalases." *Cellular and Molecular Life Sciences* 61(2):192–208.
11. Christman, M. F., G. Storz, and B. N. Ames. 1989. "OxyR, a Positive Regulator of Hydrogen Peroxide-Inducible Genes in *Escherichia Coli* and *Salmonella Typhimurium*, Is Homologous to a Family of Bacterial Regulatory Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(10):3484–88.
12. Dikalov, Sergey I. and David G. Harrison. 2014. "Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species." *Antioxidants and Redox Signaling* 20(2):372–82.
13. Dubbs, James M. and Skorn Mongkolsuk. 2012. "Peroxide-Sensing Transcriptional Regulators in Bacteria." 194(July):5495–5503.
14. Dwyer, Daniel J., Michael A. Kohanski, and James J. Collins. 2009. "Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic Action and Resistance." *Current Opinion in Microbiology* 12(5):482–89.
15. Fridovich I. 1975. "Superoxide dismutases." *Annual Review of Biochemistry* 44, 147–159.
16. Fridovich, I. 1978. "The Biology of Oxygen Radicals." *Science* 201(4359):875–80.
17. Griffiths, E. 1993. "Iron and Infection: Better Understanding at the Molecular Level but Little Progress on the Clinical Front." *Journal of Medical Microbiology* 38(6):389–900.
18. Hardy, Micael, Jacek Zielonka, Hakim Karoui, Adam Sikora, Radosław Michalski, Marcos Lopez, Jeannette Vasquez-vivar, Balaraman Kalyanaraman, and Olivier Ouari.

2018. "Detection and Characterization of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Biological Systems." 28(15):1416–32.
19. Henríquez, Tania, Nicola Victoria Stein, and Heinrich Jung. 2019. "PvdRT-OpmQ and MdtABC-OpmB Efflux Systems Are Involved in Pyoverdine Secretion in *Pseudomonas Putida* KT2440." *Environmental Microbiology Reports* 11(2):98–106.
 20. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172:6557–6567
 21. Hishinuma, Sota, Masahiro Yuki, Makoto Fujimura, and Fumiyasu Fukumori. 2006. "OxyR Regulated the Expression of Two Major Catalases, KatA and KatB, along with Peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas Putida*." *Environmental Microbiology* 8(12):2115–24.
 22. Hong, Yuzhi, Qiming Li, Qiong Gao, Jianping Xie, Haihui Huang, Karl Drlica, and Xilin Zhao. 2020. "Reactive Oxygen Species Play a Dominant Role in All Pathways of Rapid Quinolone-Mediated Killing." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75(3):576–85.
 23. Horii, Toshinobu, Hideaki Muramatsu, and Yoshitsugu Iinuma. 2005. "Mechanisms of Resistance to Fluoroquinolones and Carbapenems in *Pseudomonas Putida*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56(4):643–47.
 24. Imlay, James A. 2003. "Pathways of Oxidative Damage." *Annual Review of Microbiology* 57(1):395–418.
 25. Imlay, James A. 2008. "Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide."
 26. Johnson, Lisa A. and Laura A. Hug. 2019. "Distribution of Reactive Oxygen Species Defense Mechanisms across Domain Bacteria." *Free Radical Biology and Medicine* 140 (October 2018):93–102.
 27. Kim, So Youn, Chanseop Park, Hye Jeong Jang, Bi o. Kim, Hee Won Bae, In Young Chung, Eun Sook Kim, and You Hee Cho. 2019. "Antibacterial Strategies Inspired by the Oxidative Stress and Response Networks." *Journal of Microbiology* 57(3):203–12.

28. Kim, Jisun and Woojun Park. 2014. "Oxidative Stress Response in *Pseudomonas Putida*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(16):6933–46.
29. Martínez-García, Esteban and Víctor de Lorenzo. 2011. "Engineering Multiple Genomic Deletions in Gram-Negative Bacteria: Analysis of the Multi-Resistant Antibiotic Profile of *Pseudomonas Putida* KT2440." *Environmental Microbiology* 13(10):2702–16.
30. Martínez-García, Esteban, Tatjana Jatsenko, Maia Kivisaar, and Víctor de Lorenzo. 2015. "Freeing *Pseudomonas Putida* KT2440 of Its Proviral Load Strengthens Endurance to Environmental Stresses." *Environmental Microbiology* 17(1):76–90.
31. Martins Dos Santos, V. A. P., S. Heim, E. R. B. Moore, M. Strätz, and K. N. Timmis. 2004. "Insights into the Genomic Basis of Niche Specificity of *Pseudomonas Putida* KT2440." *Environmental Microbiology* 6(12):1264–86.
32. Messner, Kevin R. and James A. Imlay. 1999. "The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia Coli*." *Journal of Biological Chemistry* 274(15):10119–28.
33. Messner, Kevin R. and James A. Imlay. 2002. "Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase." *Journal of Biological Chemistry* 277(45):42563–71.
34. Miller, J. H. (1992). "A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria." *Biochimie* 75(6): 456.
35. Morgan, R. W., M. F. Christman, F. S. Jacobson, G. Storz, and B. N. Ames. 1986. "Hydrogen Peroxide-Inducible Proteins in *Salmonella Typhimurium* Overlap with Heat Shock and Other Stress Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(21):8059–63.
36. Nelson, K. E., C. Weinl, I. T. Paulsen, R. J. ... C. M. Fraser. 2003. "Erratum: Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Metabolically Versatile *Pseudomonas Putida* KT2440 (*Environmental Microbiology* 4:12 (799-808))." *Environmental Microbiology* 5(7):630.

37. Ochsner, Urs A., Michael L. Vasil, Eyad Alsabbagh, Kislay Parvatiyar, and Daniel J. Hassett. 2000. "Role of the *Pseudomonas Aeruginosa* OxyR-RecG Operon in Oxidative Stress Defense and DNA Repair: OxyR-Dependent Regulation of KatB-AnkB, AhpB, and AhpC-AhpF." *Journal of Bacteriology* 182(16):4533–44.
38. Park, Woojun, Samuel Peña-Llopis, Yunho Lee, and Bruce Dimple. 2006. "Regulation of Superoxide Stress in *Pseudomonas Putida* KT2440 Is Different from the SoxR Paradigm in *Escherichia Coli*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341(1):51–56.
39. Rastogi, Rajesh P., Shailendra P. Singh, Donat P. Häder, and Rajeshwar P. Sinha. 2010. "Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) by the Oxidant-Sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate in the Cyanobacterium *Anabaena Variabilis* PCC 7937." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397(3):603–7.
40. Storz, Gisela, Louis A. Tartaglia, and Bruce N. Ames. 1990. "Transcriptional Regulator of Oxidative Stress-Inducible Genes: Direct Activation by Oxidation." *Science* 248(4952):189–94.
41. Svenningsen, Nanna B., Danilo Pérez-Pantoja, Pablo I. Nikel, Mette H. Nicolaisen, Víctor De Lorenzo, and Ole Nybroe. 2015. "Pseudomonas Putida Mt-2 Tolerates Reactive Oxygen Species Generated during Matric Stress by Inducing a Major Oxidative Defense Response." *BMC Microbiology* 15(1):1–11.
42. Zheng, Ming, Fredrik Åslund, and Gisela Storz. 1998. "Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation." *Science* 279(5357):1718–21.
43. Wang, Xunde, Partha Mukhopadhyay, Matthew J. Wood, F. Wayne Outten, Jason A. Opdyke, and Gisela Storz. 2006. "Mutational Analysis to Define an Activating Region on the Redox-Sensitive Transcriptional Regulator OxyR." *Journal of Bacteriology* 188(24):8335–42.
44. Wirth, Nicolas T., Ekaterina Kozaeva, and Pablo I. Nikel. 2019. "Accelerated Genome Engineering of *Pseudomonas Putida* by I-SceI—mediated Recombination and CRISPR-Cas9 Counterselection." *Microbial Biotechnology*.

45. Wong, S. M. & J. J. Mekalanos (2000). "Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(18): 10191-10196.
46. Xiao, Yujie, Wenjing Zhu, Huizhong Liu, Hailing Nie, Wenli Chen, and Qiaoyun Huang. 2018. "FinR Regulates Expression of NicC and NicX Operons, Involved in Nicotinic Acid Degradation in *Pseudomonas Putida* KT2440." *Applied and Environmental Microbiology* **84**(20):1–14.
47. Xiao, R. and W. S. Kisaalita. 1995. "Purification of Pyoverdines of *Pseudomonas Fluorescens* 2-79 by Copper- Chelate Chromatography." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(11):3769–74.
48. Yeom, Jinki, Yunho Lee, and Woojun Park. 2012. "ATP-Dependent RecG Helicase Is Required for the Transcriptional Regulator OxyR Function in *Pseudomonas* Species." *Journal of Biological Chemistry* **287**(29):24492–504.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. http://pseudomonas.com/primarySequenceFeature/list?strain_ids=110&term=Pseudomonas+putida+KT2440+&c1=name&v1=KatA&e1=1&assembly=complete (viimati külastatud 08.06.20)
2. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin#section=Pharmacology-and-Biochemistry> (viimati külastatud 08.06.20)
3. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (viimati külastatud 08.06.20)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Triin Uussaar (07.06.1998),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“Mullabakter *Pseudomonas putida* katalaas KatA defektse tüve konstrueerimine ja iseloomustamine”,

mille juhendaja on Heili Ilves, PhD,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Triin Uussaar

08.06.2020